



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter*  
sp mediante adsorción interfacial en octadecilo-  
sepabeads**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y  
Bioquímica

**AUTOR**

Yadira FERNÁNDEZ JERÍ

**ASESOR**

Amparo Iris ZAVALA PESANTES

Lima, Perú

2013



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Fernández, Y. Inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter* sp mediante adsorción interfacial en octadecilo-sepabeads [Tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2013.

---

## **DEDICATORIA**

**A Dios, Fuente de amor e inspiración en  
mi vida, gracias por cuidar mi corazón,  
porque en tu infinito amor, me das cada día  
más de lo que espero.**

**A mi amado esposo, Miguel, por tu guía  
sugerencias y por alentarme con amor  
en cada uno de mis proyectos**

**A Yared Matias, mi querido hijo, tu apoyo  
desde mi vientre, inyectaron  
fortaleza y razón a este proyecto.**

**A mi querida madre, Rosario  
Por tu abnegación, generosidad y amor**

**A la memoria de mi padre, gracias  
Por dejarme el deseo de superación.**

**A mis queridos hermanos,  
Su apoyo y cariño estuvieron siempre  
Conmigo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora de tesis, Dra. Amparo Zavaleta. Su orientación y rigurosidad, han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco especialmente al Concejo de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), por la subvención económica que fue de gran ayuda durante mis estudios doctorales y en la culminación de la tesis.

Mi más sincero agradecimiento al Jurado examinador: Dr. Fernando Quevedo Ganoza, Dr. Julio Santiago Contreras, Dra. Ana María Muñoz Jáuregui; Dr. Medardo Alberto Quezada Alvarez, Dra. Amparo Zavaleta Pesantes. por sus valiosos aportes para la optimización de este trabajo de investigación y en especial por la valoración y calificación del mismo..

A los miembros del laboratorio de Biología molecular, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica –UNMSM, por brindarme su apoyo durante el desarrollo experimental de la tesis.

Expreso mi sincero reconocimiento a mis amigos, parientes y otras personas que de uno y otro modo contribuyeron a la culminación de la presente investigación.

## Tabla de Contenido

1.- Introducción.....	1
2.- Marco teórico.....	4
2.1.- Lipasas.....	4
2.1.1.- Mecanismo de acción lipolítica.....	7
2.1.2.- Fuente de obtención de lipasas.....	8
2.1.3.- Reacciones catalizadas por lipasas.....	9
2.1.3.1.- Reacciones de esterificación.....	10
2.1.3.2.- Reacciones de transesterificación.....	10
2.1.3.3.- Reacciones de interesterificación.....	10
2.1.4.- Clasificación de las lipasas.....	11
2.1.5.- Propiedades bioquímicas de las lipasas.....	13
2.1.5.1.- Efecto de inhibidores y activadores.....	13
2.1.5.2.- pH óptimos en lipasa.....	14
2.1.5.3.- Temperatura óptima y estabilidad térmica.....	15
2.1.5.4.- Peso molecular.....	15
2.1.6.- Importancia industrial de las lipasas.....	16
2.2.- Inmovilización de enzimas.....	18
2.2.1.- Métodos de inmovilización.....	19
2.2.1.1 Inmovilización por retención física.....	20
2.2.1.2 Inmovilización por unión química.....	22
2.2.2.- Efectos de la inmovilización.....	27
2.2.3.- Soportes empleados en inmovilización de enzimas.....	29
2.2.3.1.- Características de los soportes para inmovilización.....	30
2.2.4.- Parámetros de inmovilización.....	32
2.3.- Inmovilización de lipasas.....	33
2.3.1. Inmovilización de lipasa en soportes hidrofóbicos.....	37
2.3.2. Soporte hidrofóbico “Sepabead” .....	39
2.3.3.- Lipasas producidas por el género <i>Marinobacter</i> .....	42
2.3.4.- Aplicaciones industriales de las lipasas inmovilizadas.....	43
2.3.4.1. Industria de alimentos.....	43
2.3.4.2. Resolución de mezclas racémicas.....	43
2.3.4.3. Aplicaciones médicas.....	44
2.3.4.4. Lipasas como biosensores.....	45
2.3.4.5. Tratamiento de efluentes y aguas residuales.....	45
2.3.4.6. Uso de lipasas en la producción de biodiesel.....	45
3.- Materiales y métodos.....	47
3.1.- Obtención del crudo enzimático.....	47
3.2.- Determinación de la actividad enzimática.....	48
3.3.- Determinación de proteínas totales por el método de Bradford.....	49
3.4. Caracterización bioquímica de la lipasa .....	49
3.4.1.- Determinación de los factores que afectan la actividad enzimática.....	49
3.4.2.- Determinación de los parámetros cinéticos.....	50
3.5.- inmovilización de la lipasa en octadecilo-sepabead.....	50

3.5.1- Determinación de los factores que influyen en la inmovilización.....	51
3.6. Efecto de la temperatura y pH en la actividad de la enzima inmovilizada.....	53
3.7.- Termoestabilidad de la lipasa inmovilizada en octadecilo sepabead.....	54
3.8.- Análisis Estadístico.....	55
4.- Resultados.....	56
4.1.-Caracterización de la lipasa soluble producida por Marinobacter sp.....	56
4.1.1.- Factores que afectan la actividad enzimática de la lipasa.....	56
4.1.2.- Parámetros cinéticos de la lipasa de Marinobacter sp.....	63
4.2.- Inmovilización de lipasa producida por Marinobacter sp CH27 en el soporte.....	64
4.3 Actividad de la lipasa inmovilizada a diferentes pH y temperatura.....	75
4.4. Termoestabilidad de la lipasa der Marinobacter sp CH27.....	81
5.- Discusiones .....	84
5.1. Caracterización bioquímica de la lipasa libre (en solución).....	84
5.2.- Optimización de la inmovilización de lipasa producida por Marinobacter sp CH27.....	89
5.3. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la lipasa inmovilizada.....	94
5.4. Estabilidad térmica de la lipasa inmovilizada en octadecilo-sepabead.....	97
6.- CONCLUSIONES.....	100
7.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	101
8.- ANEXOS.....	106

## LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Inhibidores y activadores de lipasas microbianas.	13
<i>Tabla 2.</i> pH óptimo de lipasas microbianas	14
<i>Tabla 3.</i> Temperatura óptima y termoestabilidad de lipasas microbianas	15
<i>Tabla 4.</i> Pesos moleculares de lipasas microbianas	16
<i>Tabla 5.</i> Comparación entre distintas técnicas de inmovilización	27
<i>Tabla 6.</i> Parámetros característicos para analizar enzimas inmovilizadas	31
<i>Tabla 7.</i> Métodos y soportes empleados en la inmovilización de lipasas	34
<i>Tabla 8.</i> Diseño estadístico experimental Box- Behnken de superficie respuesta a 3 niveles y 3 factores, para la inmovilización de lipasa producida por <i>Marinobacter sp.</i>	52
<i>Tabla 9.</i> Efecto de la temperatura y el pH en la actividad de la enzima inmovilizada de <i>Marinobacter sp CH27</i> , mediante el diseño compuesto central de superficie respuesta a 2 factores y 3 niveles (*).	54
<i>Tabla 10.</i> Actividad enzimática de la lipasa producida por <i>Marinobacter sp CH27</i> , según diseño estadístico experimental Box- Behnken de superficie respuesta.	57
<i>Tabla 11.</i> Análisis de varianza del análisis superficie respuesta a 5 factores y 3 niveles para la actividad específica de lipasa cruda producida por <i>Marinobacter sp CH27</i> .	62
<i>Tabla 12.</i> Proteína inmovilizada al soporte octadecilo –sepabead durante el proceso de inmovilización de lipasa de <i>Marinobacter sp CH27</i> .	65
<i>Tabla 13.</i> Variación de la actividad específica durante el proceso de inmovilización de lipasa de <i>Marinobacter sp CH27</i> en octadecilo –sepabead.	66
<i>Tabla 14.</i> Análisis de varianza de la actividad enzimática * de la lipasa inmovilizada en octadecilo sepabead	70
<i>Tabla 15.</i> Análisis de varianza de la concentración de proteína inmovilizada en octadecilo sepabead.	72
<i>Tabla 16.</i> Coeficientes de regresión estimados para la respuesta de actividad específica	75
<i>Tabla 17.</i> Actividad residual de la lipasa inmovilizada en octadecilo-sepabead	76
<i>Tabla 18.</i> Efecto de la temperatura y el pH en la Actividad enzimática de la lipasa inmovilizada según el Diseño compuesto central a 2 factores y 3 niveles	77



*Tabla 19.* Análisis de varianza de la actividad específica de la lipasa inmovilizada en octadecilo sepabead frente a diferentes pH y temperatura 78

Tabla 20. Coeficientes de regresión estimados para la respuesta de Actividad específica de la lipasa inmovilizada de *Marinobacter sp CH27* 81

*Tabla 21.* Termoestabilidad de la lipasa de *Marinobacter sp CH27* libre e inmovilizada en octadecyl-sepabead 82

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Diagrama esquemático del plegamiento $\alpha/\beta$ hidrolasas	5
<i>Figura 2.</i> Conformación del lid en varias lipasas	6
<i>Figura 3.</i> Modelo para una molécula de triglicérido en el sitio activo de la lipasa	8
<i>Figura 4.</i> Tipos de reacciones de transesterificación de lipasas	10
<i>Figura 5.</i> Reacciones de interesterificación con lipasas	10
<i>Figura 6.</i> Métodos de inmovilización por retención física	20
<i>Figura 7.</i> Métodos de inmovilización por unión química	23
<i>Figura 8.</i> Procedimientos para inmovilizar enzimas	33
<i>Figura 9.</i> Actividades lipasa/estearasa de lipasa soluble e inmovilizada	37
<i>Figura 10.</i> Adsorción de lipasa a soportes hidrofóbicos	37
<i>Figura 11.</i> Línea de Productos Sepabead	41
<i>Figura 12.</i> Actividad de la lipasa producida por <i>Marinobacter sp CH27</i> , Según: temperatura, pH, concentración de cloruro de sodio Y cloruro de calcio	59
<i>Figura 13.</i> Efectos principales en la actividad enzimática de lipasa producida por <i>Marinobacter sp CH27</i>	60
<i>Figura 14.</i> Gráficas de contorno para la actividad específica de la lipasa de <i>Marinobacter sp CH27</i>	61
<i>Figura 15.</i> Gráfico de dobles recíprocos (Lineweaver Burk), empleando diferentes concentraciones de pNPP, buffer fosfato pH 7.0 y temperatura de 37°C	64
<i>Figura 16.</i> Factores que influyen sobre la adsorción de la proteína al soporte octadecilo sepabead	67
<i>Figura 17.</i> Factores que influyen en la actividad específica de la enzima inmovilizada en octadecilo sepabead	67

Figura 18. Gráficas de contorno de dos factores, de la actividad específica de la lipasa durante el proceso de inmovilización	69
Figura 19. Relación entre la proteína inmovilizada y los factores, según gráficas de contorno de dos factores	71
Figura 20. Efectos principales durante la inmovilización de lipasa en soporte hidrofóbico octadecilo sepabead	73
Figura 21. Optimización del proceso de inmovilización en soporte hidrofóbico Octadecilo sepabead	74
Figura 22. Relación entre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada de <i>Marinobacter sp CH 27</i> y el pH y temperatura. Según gráfico de contorno.	77
Figura 23. Efectos principales entre la actividad específica de la lipasa inmovilizada (U/g soporte) y el pH y temperatura	79
Figura 24. pH y Temperaturas óptimas de la lipasa inmovilizada en soporte hidrofóbico Octadecilo sepabead	80
Figura 25. Termoestabilidad del extracto crudo e inmovilizado de <i>Marinobacter sp CH 27</i>	83

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue inmovilizar por adsorción interfacial la lipasa producida por *Marinobacter sp* en el soporte hidrofóbico octadecilo-sepabead. Para ello, se empleó la lipasa extracelular producida por *Marinobacter sp* en medio agua de sales conteniendo extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 5%, aceite de olivo al 1 %, triton x-100 al 0,1 % a 37 ° C. Para optimizar la actividad de la enzima y entender la significancia de la interacción de los factores que afectan la actividad de la lipasa tanto libre como inmovilizada se utilizó la metodología de superficie respuesta. La lipasa de *Marinobacter sp* expreso máxima actividad específica de hidrólisis del para-nitrofenil palmitato (p-NPP) en buffer fosfato pH 7,0 a 37 °C y 30 min en ausencia de NaCl y CaCl<sub>2</sub>. El diseño experimental Box-Behnken a 3 factores y 3 niveles se empleó para evaluar el efecto de los parámetros de inmovilización tales como pH a 6,0; 7,0; y 8,0; tiempo a 30, 60 y 120 min; fuerza iónica a 2,5, 5,0 y 10,0 mM. El proceso de inmovilización óptimo se realizó a pH 6,62, 30 min y fuerza iónica 10 mM, los datos se ajustaron al modelo polinomial cuadrático. Las condiciones óptimas de inmovilización fueron 15 mg de proteína total conteniendo la lipasa por gramo de soporte de octadecilo-sepabead, cuyo rendimiento fue 74 %. Además, se evaluó el efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada según el diseño compuesto central a dos factores y 3 niveles. Así, la máxima actividad se obtuvo a pH 7,0 y 50 °C. Finalmente, la estabilidad térmica de la lipasa inmovilizada de *Marinobacter sp* retuvo 80 % de su actividad después de 24 horas a pH 7,0 y 40 °C.

**Palabras clave:** Lipasa, *Marinobacter sp*, inmovilización, soporte hidrofóbico, octadecilo sepabead, adsorción interfacial, metodología superficie respuesta.

## ABSTRACT

The aim of this study was immobilized by interfacial adsorption the lipase produced by *Marinobacter sp* in octadecyl-Sepabead hydrophobic support. To achieve this, we used the extracellular lipase produced by *Marinobacter sp* in salt water medium containing 0.5% yeast extract, 5%NaCl, 1% olive oil, 0.1% Triton X-100 at 37 ° C for 24 hours. To optimize enzyme activity and understand the significance and interaction of the factors that affect the activity of both free and immobilized lipase, we used the response surface methodology. Lipase produced by *Marinobacter sp* expressed maximum specific activity of hydrolysis for para-nitrophenyl palmitate (p-NPP) in phosphate buffer pH 7,0 at 37 ° C for 30 min in the absence of NaCl and CaCl<sub>2</sub>. 3 –level - 3 factor Box-Behnken design factors, was employed to evaluate the effects of immobilization parameters such as pH 6,0; 7,0, and 8,0, time of 30, 60 and 120 min, ionic strength to 2,5 mM, 5,0 mM and 10,0 mM. Optimal immobilization process was achieved at pH 6,62; 30 min and ionic strength of 10 mM, Quadratic polynomial equation was obtained for predicting enzymatic activity of immobilized lipase. Immobilization optimal conditions were 15 mg total protein per lipase gram containing support octadecyl-Sepabead, whose yield was 74%.

Furthermore, we assessed the effect of temperature and pH on the enzyme activity of immobilized lipase according to the central composite design of 3 levels and 2 factors. Thus, the maximum activity was obtained at pH 7,0 and a temperature set to 50 ° C. Finally, the thermal stability of the immobilized lipase *Marinobacter sp* retained 80% of its activity after 24 hours at pH 7,0 and 40 ° C.

**Keywords:** Lipase, *Marinobacter sp*, inmovilization, hydrophobic support, octadecyl - sepabead, interfacial adsorption, response surface methodology.

## 1.- INTRODUCCION

La demanda de enzimas industriales principalmente de origen microbiano se ha incrementado, debido a sus diversas aplicaciones y por presentar ventajas frente a una serie de catalizadores químicos. El 75 % de todas estas enzimas son hidrolasas, y el 90 % de ellas son producidas por fermentación microbiana <sup>(1)</sup>.

Las lipasas (triacylglycerol ester hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran en microorganismos, plantas y animales, pertenecen a la familia de las hidrolasas, cuya actividad *in vivo* es la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos unidos a triacilglicerol, catalizan reacciones de hidrólisis de grasas y aceites. Además de las reacciones de hidrólisis, las lipasas catalizan, la síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos en medios no acuosos, en reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación, son estables en solventes orgánicos, presentan amplia especificidad por sustrato y elevada regioselectividad y/o estereoselectividad en la catálisis <sup>(2)</sup>.

Las lipasas presentan amplias propiedades bioquímicas, son empleadas en diferentes industrias tales como: alimentos, detergentes, farmacéutica, médica, textil, cosmética, papelera. En los últimos años, las lipasas se usan en nuevas aplicaciones como síntesis de biopolímeros y biodiesel, producción de medicamentos enantioselectivos y

agroquímicos, saborizantes entre otros <sup>(1,3)</sup>. A nivel industrial, los mecanismos de catálisis de las lipasas se asemejan a los procesos metabólicos naturales, lo que hace que sean biodegradables y no contaminen el medio ambiente. Por las aplicaciones antes descritas, las lipasas producidas por nuevos microorganismos están en constante investigación.

A pesar de las aplicaciones descritas, las lipasas como la mayoría de enzimas nativas, presentan baja estabilidad térmica, lo cual limita su actividad óptima en reacciones enantio y regioselectivas. Por otro lado la separación de los sustratos y productos, dificultan su reusó en diferentes procesos <sup>(4)</sup>. Es por ello, el interés en el desarrollo tecnológico de biocatalizadores, que presenten mejores propiedades térmicas con estabilidad en un rango deseado de pH y en presencia de solventes orgánicos, que sean de fácil recuperación del producto, permitan obtener un producto no contaminado, incrementen la estabilidad operacional del biocatalizador. Una alternativa tecnológica es la inmovilización de enzimas, la cual permite optimizar la estabilidad y la actividad de la enzima <sup>(4,5)</sup>.

Uno de los protocolos de inmovilización de lipasas, es la adsorción selectiva sobre soportes hidrofóbicos, para su uso tanto en medios acuosos como orgánicos. Esta estrategia aprovecha el mecanismo complejo de actividad que presentan las lipasas para ser inmovilizadas en interfaces vía una estrategia de afinidad. Los soportes hidrofóbicos empleados se comportan como los sustratos naturales de estas enzimas <sup>(6)</sup>. La adsorción involucra áreas hidrofóbicas alrededor del centro activo, quedando en su forma abierta accesible al sustrato.

El soporte hidrofóbico octadecilo – sepabead (Mitsubishi Chemical Corporation) está compuesto de una matriz polimérica de metacrilico, cubierto por grupos octadecilo, que proporcionan una superficie fuertemente hidrofóbica. Este soporte presenta estabilidad

química y térmica, resistencia al shock osmótico, alta capacidad de unión a proteínas, baja tendencia al hinchamiento en soluciones de elevada molaridad y en solventes <sup>(7)</sup>.

En el presente estudio se utilizó la metodología de superficie respuesta (MRS), para optimizar las condiciones de inmovilización, entender la significancia y la interacción de los factores que afectan la actividad específica de la lipasa nativa de *Marinobacter sp*, bacteria halófila moderada aislada de las Salinas de Pilluana (San Martín) <sup>(8)</sup>, para lo cual se ensayaron diferentes condiciones de inmovilización para futuros usos de la enzima inmovilizada.

Los objetivos de la presente investigación fueron:

- Inmovilizar la lipasa producida por *Marinobacter sp* por adsorción interfacial en el soporte hidrofóbico octadecilo-sepabead.
- Caracterizar bioquímicamente el extracto crudo (enzima soluble) producido por *Marinobacter sp*.
- Determinar los factores que afectan el proceso de inmovilización.
- Determinar la interacción entre pH, temperatura y fuerza iónica durante la inmovilización de la lipasa en octadecilo- sepabead a partir de un extracto crudo.
- Determinar el modelo de simulación en la inmovilización de la lipasa de *Marinobacter sp*, mediante la metodología de superficie respuesta.
- Determinar las condiciones óptimas de inmovilización mediante la metodología de superficie respuesta.
- Determinar el efecto de la temperatura y el pH en la actividad de la enzima inmovilizada mediante la metodología de superficie respuesta.
- Determinar la termoestabilidad de la lipasa inmovilizada.



## 2.- MARCO TEÓRICO

### 2.1.- Lipasas

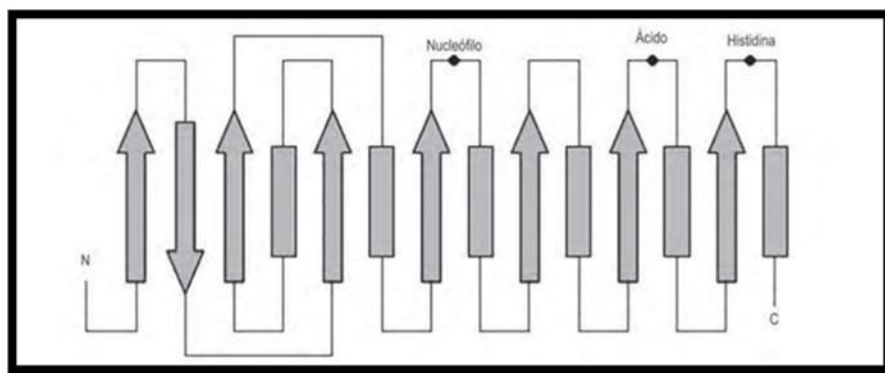
Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) son éster hidrolasas carboxílicas, catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en la interfase lípido-agua. *In vivo* catalizan la hidrólisis de triglicéridos para obtener como productos ácidos grasos libres y glicerol o productos intermedios como mono o diglicéridos <sup>(1)</sup>.

Su función biológica es incierta en muchos casos, aunque parece que están relacionadas con la bioconversión de lípidos entre diferentes organismos y dentro del mismo organismo, en relación con diferentes procesos como el aprovechamiento de fuentes de carbono y la modificación o el reciclaje de las membranas celulares, así como en la detoxificación de biocidas y agentes contaminantes. Además, estas enzimas pueden actuar como factores de virulencia en determinadas patologías. <sup>(2,3)</sup>

Además de su rol fisiológico, las lipasas catalizan la hidrólisis o síntesis enantio y regio-selectiva de una amplia variedad de sustratos naturales, así mismo pueden llevar a cabo la esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos <sup>(4)</sup>

En la naturaleza, las lipasas actúan en interface orgánica-acuosa, teniendo como substratos ésteres insolubles hablándose entonces de actividad lipolítica, iniciando con un fenómeno de adsorción inicial sobre la fase orgánica, al que sigue la reacción propiamente dicha sobre la interfase, con la formación del complejo enzima-substrato y posterior liberación de productos a la fase acuosa. Su cinética no se ajusta al modelo clásico de Michaelis –Menten.

Con respecto a su estructura, todas las lipasas presentan una estructura central formada por 8 láminas  $\beta$  interconectadas por hélices  $\alpha$ , plegamiento típico de las  $\alpha/\beta$ hidrolasas formando de esta manera el centro activo, que puede estar cubierto por una tapa en las lipasas auténticas, conteniendo tres aminoácidos catalíticos cuya posición dentro del plegamiento suele estar conservada: una serina nucleofílica, un ácido aspártico o un ácido glutámico y una histidina. La serina catalítica está generalmente incluida en el pentapéptido conservado Gly(Ala)-Xaa-Ser-Xaa-Gly, el cual forma un giro entre la lámina  $\beta_5$  y la siguiente hélice  $\alpha$  cuya función es estabilizar y orientar la serina nucleofílica, y que es conocido como “nucleophilic elbow (Figura 1).



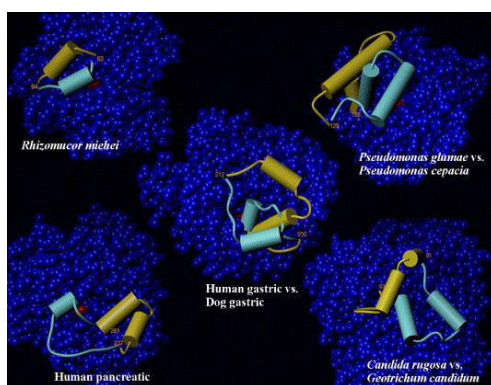
**Figura 1.** Diagrama esquemático del plegamiento  $\alpha/\beta$ hidrolasas, presente en el dominio catalítico canónico de las lipasas. Flechas: cadenas  $\beta$ . Rectángulos: hélices  $\alpha$ . Conexiones: lazos. Puntos: residuos que componen la tríada catalítica. N y C: extremos amino y carboxilo – terminal.

*Fuente.* Gonzáles – Bacerio (2010)

Además, el centro activo contiene otras estructuras que intervienen en la estabilización los intermediarios producidos durante la catálisis (“oxyanion hole”), o que se encargan de acomodar el ácido graso a escindir u otras partes del sustrato, y cuyas características condicionan la especificidad de sustrato y la selectividad de estas enzimas <sup>(5)</sup>.

Cuando el centro activo está cubierto por una hélice  $\alpha$  anfifílica o por un lazo (Lid), se encuentra en su forma cerrada o inactiva, que impide la entrada del sustrato. Este solo tiene acceso cuando la enzima se encuentra en su conformación activa y la cubierta se ha desplazado. En su conformación activa, las lipasas presentan en su centro activo un grupo de residuos hidrofóbicos dispuestos alrededor de la serina catalítica que constituye una región electrofílica conocida como cavidad oxianiónica. Además alrededor del centro activo se encuentra una superficie apolar que se conoce como zona de contacto lipídico. También están presentes algunas moléculas de agua que participan en interacciones importantes para mantener la conformación del sitio activo catalíticamente competente.

En resumen la estructura nativa de las lipasas es un sistema dinámico de interconversión entre la estructura cerrada que predomina en ambientes homogéneos, y la estructura abierta, que se estabiliza en la interface lípido-agua, en la figura 2 se presenta la estructura cerrada y abierta de algunas lipasas.



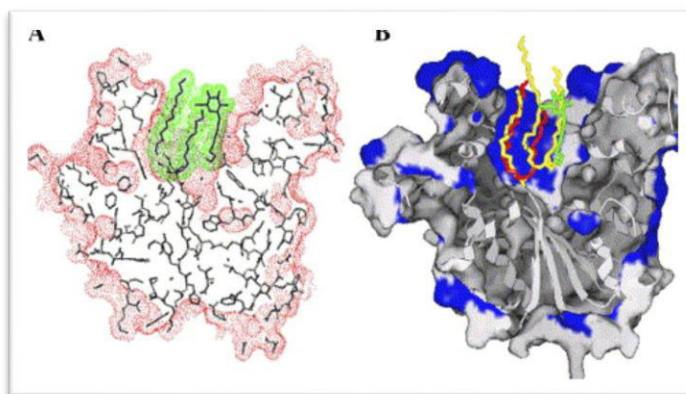
**Figura 2. Conformación del lid en varias lipasas. Conformación cerrada (lazo azul) y abierta (lazo amarillo).**

*Fuente.* Ahmed (2006)

### 2.1.1 Mecanismo de Acción lipolítica

El mecanismo catalítico de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de cuatro etapas. Primero, se produce una unión al sustrato, seguidamente se produce un ataque nucleofílico sobre el enlace éster del lípido, por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica, lo que conlleva a la ruptura del enlace. A continuación se produce la formación de un intermediario entre el ácido graso y la serina nucleofílica liberándose el alcohol y finalmente se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que al atacar el enlace éster del intermediario transitorio, logra la liberación del ácido graso y la regeneración del sitio catalítico <sup>(9)</sup>

Las lipasas requieren de la activación interfacial para desplegar al máximo su actividad catalítica, este fenómeno se da en presencia de interface lípido-agua <sup>(1)</sup>. Ello posibilita que la cubierta del centro activo se desplace y se produzca una restructuración en la conformación de la molécula, como resultado los aminoácidos catalíticos quedan expuestos al solvente en una orientación adecuada, y alrededor de estos se conforma la cavidad oxianiónica, por exposición de determinados residuos hidrofóbicos e internalización de otros hidrofílicos <sup>(5)</sup>. Las características físico-químicas del sustrato también contribuyen de manera significativa a la activación interfacial. En el estado agregado, los triacilglicéridos exhiben un grado de ordenamiento elevado, que minimiza el número de estados conformacionales que pueden presentar estas moléculas en solución acuosa, debido a la gran flexibilidad de sus cadenas de ácidos grasos. Este efecto tiene implicaciones favorables para el reconocimiento enzima-sustrato como se presenta en la figura 3 <sup>(9)</sup>.



**Figura 3. Modelo para una molécula de triglicerido en el sitio activo de la lipasa.**

*Fuente.* Ahmed (2006)

### 2.1.2.- Fuente de obtención de lipasas

Las lipasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, son producidas por células animales, vegetales y microbianas <sup>(1)</sup>, en la actualidad se producen vía fermentación a partir de una amplia variedad de microorganismos, por sus elevados rendimientos en la producción, fácil manipulación genética, producción continua con ausencia de fluctuaciones estacionales, empleo de sustratos de bajo costo, lo que hace que su producción sea más conveniente y segura <sup>(2)</sup>. La presencia de lipasas en bacterias fue reportada a partir de 1901 en las especies de *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus*, y *B. fluorescens*, ahora llamadas *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *P. fluorescens*, respectivamente, que en la actualidad son las especies bacterianas más estudiadas en cuanto a la producción de lipasas <sup>(4)</sup>. Las investigaciones posteriores han demostrado que la producción de lipasas de origen bacteriano, se encuentran distribuidas tanto en bacterias Gram positivas como Gram-negativas. Dentro del grupo de las Gram positivas, las lipasas de *B. Subtilis*, han sido caracterizadas bioquímicamente y sus

genes clonados. Sin embargo las bacterias Gram negativas, son las más estudiadas siendo *Pseudomonas* el principal representante del género.

La ubicuidad de las lipasas hace que continuamente se reporten nuevos organismos potencialmente productores <sup>(10,12)</sup>. La especificidad de la lipasa está directamente relacionada al microorganismo productor, se han descrito lipasas no específicas que hidrolizan el triglicérido en cualquier posición, obteniendo productos intermedios (1,2) (2,3) (1,3) diglicérido y monoglicérido. A este grupo pertenece la lipasa de *Candida rugosa* y *Candida curvata* <sup>(12)</sup>.

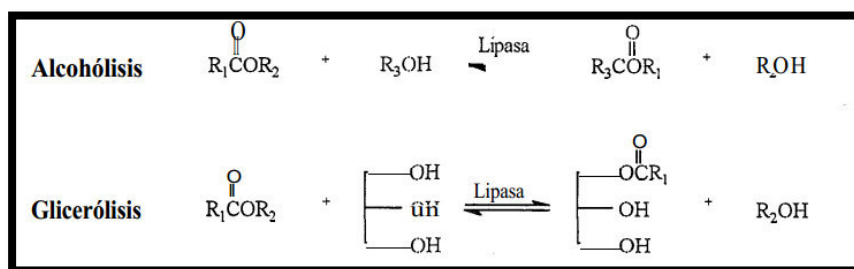
Entre las lipasas de mayor relevancia tecnológica, que se encuentran comercialmente disponibles, tanto en forma libre como inmovilizada <sup>(2, 13)</sup>, Se tiene a *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, y entre lipasas de origen bacteriano: *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* y *Chromobacterium viscosum*.

### 2.1.3.- Reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas son versátiles, la acción específica que tienen sobre enlaces químicos determinados permite una amplia serie de aplicaciones como la resolución de compuestos quirales y la obtención, con un alto rendimiento, de ácidos grasos de elevada pureza a partir de aceites y grasas; A demás pueden catalizar reacciones no lipolíticas haciendo que estas enzimas tengan una amplia utilización en reacciones diversas, las lipasas son capaces de llevar a cabo las siguientes reacciones:

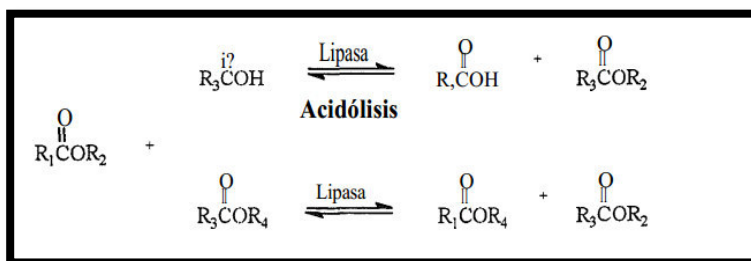
**2.1.3.1 Reacciones de esterificación.** Las reacciones de esterificación se dan entre un alcohol y un ácido graso libre, son reacciones reversas a la hidrólisis catalizadas bajo condiciones de baja actividad de agua.

**2.1.3.2 Reacciones de transesterificación.** Se define como una reacción de síntesis, en la cual el acil donador es un éster, se distinguen dos tipos de transesterificaciones, glicerólisis y alcoholólisis, según sea el glicerol o un alcohol el acil receptor. En la figura 4 se puede observar dicho mecanismo.



**Figura 4.** Tipos de reacciones de transesterificación de lipasas

**2.1.3.3 Reacción de interesterificación.** Es un proceso de intercambio de la posición de los ácidos grasos en un enlace éster, en el cual el grupo acil se intercambia entre un éster y un ácido graso o entre dos ésteres (figura 5).



**Figura 5.** Reacciones de interesterificación con lipasas

### 2.1.4 Clasificación de las lipasas

Jaeger y col. <sup>(1)</sup>, en base a la comparación de la secuencia de aminoácidos y algunas de sus propiedades biológicas lograron clasificar a las esterasas y lipasas bacterianas en 8 familias diferentes y varias subfamilias, de las cuales la familia de lipasas verdaderas, fue descrita con 6 subfamilias. Esta clasificación permitió predecir por muchos años: importantes características estructurales tales como los residuos que forman el sitio catalítico o la presencia de puentes disulfuro, el mecanismo de secreción y la posible relación entre las enzimas de otras familias.

**Lipasas verdaderas.** También llamadas grupo de *Pseudomonas*, debido a que las lipasas proceden de *Pseudomonas* han sido las primeras en estudiarse y poseen más aplicaciones industriales. En esta subfamilia la expresión de las lipasas, presentan la triada catalítica de Ser – Asp – His, y un sitio de unión a  $\text{Ca}^{++}$  con dos residuos de Asp. Además, en la mayoría existen dos residuos de cisteína que forman un puente disulfuro. La forma activa es secretada en compañía de otra proteína denominada chaperona de lipasa responsable de la actividad de la lipasa.

**Familia GDSE.** Grupo de algunas esterasas que no exhiben el pentapéptido convencional Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly.

**Familia III.** Grupo de enzimas que presentan la triada catalítica convencional, poseen una similitud del 20% en sus aminoácidos, y son de producción extracelular.

**Familia de lipasas hormona-sensitiva (HSL).** Se originaron de bacterias mesófilas, Este grupo muestra una sorprendente similitud con las secuencias de aminoácidos de la HSL de mamíferos.



**Familia V.** Grupo de enzimas que proceden de microorganismos mesófilos así como también de bacterias capaces de adaptarse a temperaturas bajas y altas. Presentan secuencias similares en un  $20 \pm 25 \%$  con otro grupos de enzimas no lipolíticas tales como epóxido hidrolasas, de halogenasas y haloperoxidasas.

**Familia VI.** Esta familia de enzimas presenta la clásica triada catalítica en su centro activo (Ser – Asp – His). Tienen una masa molecular entre  $23 \pm 26$  kDa y son las más pequeñas esterasas.

**Familia VII.** Este grupo está formado por esterasas grandes de aproximadamente 55 kDa y presentan una identidad del 30% y una similitud del 40% con esterasas acetilcolina eucarióticas, y carboxylesterasas de intestino e hígado.

**Familia VIII.** Las tres enzimas que forman esta familia son de aproximadamente 380 residuos de longitud y muestran una sorprendente similitud con varias enzimas de la clase C de las  $\beta$ -Lactamasas.

En el 2010 Messaoudi y col <sup>(11)</sup> , plantearon una reclasificación de la familia I (las lipasas verdaderas) en 11 subfamilias en base a la comparación de las secuencias de aminoácidos y algunas de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. La propuesta subdividir la familia I de lipasas verdaderas en:

- Subfamilia, lipasas de *Pseudomonas* (I1, I2, I3 y I10)
- Subfamilia, lipasas de *Bacillus* (I4)
- Subfamilia, lipasas de *Staphylococcal* (I5)
- Subfamilia, lipasas GDSL (I6)
- Subfamilia, lipasas GGGX (I7)
- Subfamilia, lipasas de bacterias marinas (I11)
- Subfamilia, de otras lipasas (I8, I9)

## 2.1.5. Propiedades bioquímicas de las lipasas

### 2.1.5.1 Efecto de Inhibidores y activadores

Los ensayos de inhibidores en la actividad de las lipasas han demostrado que los iones de metales pesados inhiben la actividad en tanto que los iones de metales alcalinos se comportan como activadores (tabla 1).

**Tabla 1. Inhibidores y activadores de lipasas microbianas.**

Fuente	Inhibidores	Activadores
<i>H. lanuginosa</i>	$\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Sn}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$	$\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$
<i>P. nitens</i>	$\text{Ag}^+$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{KmnO}_4$ ,	Sales biliares
<i>C. deformans</i>	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , EDTA	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$
<i>C. rugosa</i>	$\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$	-----
<i>P. fluorescens</i>	$\text{I}^-$ , $\text{Fe}^{3+}$	$\text{Ba}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$
<i>C. viscosum</i>	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Sn}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , sales biliares
<i>Bacillus spp</i>	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$	-----

Fuente. Banu (2001)

El calcio ha sido descrito como el activador más efectivo en la actividad lipolítica. Este ion estimula la hidrólisis del aceite de oliva al actuar produciendo cambios conformacionales en la encima que favorecen la unión con el sustrato<sup>(14)</sup>.

### 2.1.5.2 pH óptimos en lipasas

La estructura terciaria de la proteína depende de las interacciones tales como puentes de hidrogeno entre los grupos R. Un cambio en el pH puede alterar la ionización de la cadena y altera la conformación nativa y en algunos casos hasta puede ocasionar desnaturalización de la enzima. Cada enzima presenta un rango óptimo de pH que ayuda a mantener la conformación nativa en el medio en el cual se opera.

El pH óptimo para la mayoría de las lipasas se encuentra en el rango de 7,0 a 9,0 aunque algunas presentan un amplio rango entre el 4,0 a 10,0; además, las lipasas microbianas presentan excelente estabilidad alrededor del pH 6,0 a 7,5 así por ejemplo se ha descrito la lipasa de *Pseudomonas spp.* es óptimamente activa a pH 7,0 demostrando estabilidad entre 5,0 y 10,5 como resultado de la adaptación natural de la bacteria. A continuación se presenta la tabla 2 con algunos pH óptimos que han sido descritos para las lipasas microbianas <sup>(15)</sup>.

**Tabla 2. pH óptimo de lipasas microbianas**

Fuente	Sustrato	pH óptimo
<i>C. cylindracea</i>	aceite de oliva Tributirina	5.30 – 7,00
<i>P. fluorescens</i>	aceite de sésamo	7,00
<i>Bacillus spp</i>	aceite de oliva	7,00
<i>G. candidum</i>		
<i>Lipasa I</i>	aceite de oliva	8,00
<i>Lipasa II</i>	aceite de oliva	6,00
<i>H. lanuginosa</i>	aceite de oliva	7,00
<i>P. nitens</i>	aceite de oliva	6,00
<i>C. rugosa</i>	aceite de oliva	7,00
<i>S. thermophilus</i>	Tributirina	9,00
<i>Pseudomonas spp.</i>	Aceite de maíz	8,50

Fuente. Banu (2001)

### 2.1.5.3. Temperatura óptima y estabilidad térmica

Las lipasas son conocidas por presentar actividad en un amplio rango de temperatura. Las lipasas de plantas y animales son usualmente menos estables que las de origen microbiano. Así por ejemplo se ha demostrado que la lipasa producida por *Aspergillus niger* presenta temperatura óptima y estabilidad térmica a 50°C (tabla 3)<sup>(14)</sup>.

**Tabla 3. Temperatura óptima y termoestabilidad de lipasas microbianas**

Fuente	Temperatura optima °C	Termoestabilidad °C
<i>P. fluorescens</i>	45	nd
<i>P. nitens</i>	40	40 (10 min)
<i>Bacillus spp</i>	60	65 (30 min)
<i>C. deformans</i>	40 – 50	nd
<i>S. thermophiles</i>	45	45 ( 1semana)
<i>H. lanuginose</i>	45 -55	65 (60 min)
<i>C. viscosum</i>	65	60 (10 min)
<i>C. rugosa</i>	30 -35	nd

Fuente. Fadiloglu (1996)

### 2.1.5.4. Peso molecular

El peso molecular de las lipasas difiere entre 20 y 60 K Da, dependiendo de la fuente aunque muy pocas pueden presentar PM más altos como es el caso de *Candida cylindraceae*, que tiene un PM de 120 KDa

A continuación se presenta los pesos moleculares y la metodología empleada para ello, de algunas lipasas (tabla 4).

**Tabla 4. Pesos moleculares de lipasas microbianas**

Fuente	Peso Molecular KDa	Metodología
<i>P. fluorescens</i>	32,0	geles de filtración
<i>P. nitens</i>	26,5	geles de filtración
<i>Bacillus spp</i>	22,0	geles de filtración
<i>H. lanuginose</i>	39,0	geles de filtración
<i>C. cylindracea</i>	67,0	PAGE
<i>A. japonicus</i>	155,0	geles de filtración

Fuente. Banu (2001)

### 2.1.6. Importancia industrial de las lipasas

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante en enzimología ha permitido el desarrollo de diferentes industrias a nivel mundial destinadas a la producción de enzimas para diferentes usos, entre las transnacionales que producen lipasas producidas por fermentación microbiana de microorganismos modificados genéticamente para fines industriales se encuentran las tres más grandes: Novo Nordisk (Novozymes A/S, North America), Genencor International Inc. (California, USA) y DSM N.V. Enzymes (Netherlands) <sup>(16)</sup>.

El interés por estas enzimas se ha acrecentado en los últimos años debido a sus diversas propiedades catalíticas en diferentes aplicaciones industriales, tales como: aditivos en la formulación de detergentes, en la industria alimentaria para la elaboración de productos dietéticos con bajo nivel de grasas y colesterol, en la industria del papel con el objetivo de eliminar la cera de la pulpa del papel, en la industria farmacéutica en la obtención de moléculas bioactivas así como en procesos de síntesis química para la obtención de compuestos óptimamente puros, modificación de grasas y otros lípidos por hidrólisis y esterificación.

Las aplicaciones industriales están ligadas precisamente al tipo de reacción que pueden catalizar, es así como se pueden tener las siguientes aplicaciones <sup>(1,2,4)</sup>

**A.- Reacciones de hidrólisis**

- ✓ Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica
- ✓ Producción de aromas y sabores en la industria alimentaria
- ✓ Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasa
- ✓ Resolución de mezclas quirales

**B.- Reacción de Síntesis**

- ✓ Síntesis de triglicéridos
- ✓ Producción de esteroides para la industria farmacéutica
- ✓ Resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica
- ✓ Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes

**C.- Reacciones de interesterificación**

- ✓ Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos
- ✓ Eliminación de ácidos grasos responsables de causar inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas

**D.- Reacciones de transesterificación**

- ✓ Preparación de compuestos enantioméricamente puros
- ✓ Transesterificación enantioselectivas dobles

Otro punto de importancia es la resolución vía hidrólisis, síntesis y transesterificación, de productos finales o intermediarios de la industria farmacéutica se ha incrementado

espectacularmente tanto en la investigación académica como en la industrial, las principales razones que han motivado este cambio en el interés por este tipo de compuestos es principalmente en el beneficio médico de usar únicamente el compuesto óptimamente puro algunos de los trabajos que se han realizado lo demuestran:

- Preparación de cicloalcoholes enantiómericamente puros como intermediarios de reacciones de interés farmacológico.
- Síntesis enantioselectiva de  $\alpha$  amino- $\beta$ - hidroxiacidos como productos para elucidar estructuras tri dimensionales de proteínas y péptidos.
- Preparación de análogos de hormonas enantioméricamente puras
- Producción de agentes antipsicóticos como derivados de butirofenonas enantioméricamente puros.
- Bioconversión de triglicéridos con ácidos grasos poliinsaturados a hidroperóxidos de alta reactividad en la industria alimentaria.
- Síntesis de compuestos fluoroorgánicos de interés en medicina y biología en síntesis de biomoléculas.
- Síntesis de antioxidantes derivados de la vitamina E (benzofuraniles) para el tratamiento de ciertas enfermedades.

## 2.2. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica, las principales ventajas de obtener enzimas inmovilizadas son <sup>(17)</sup>:

- ✓ Reutilización de la enzima.
- ✓ Aumentar la concentración de enzima en el medio de reacción.
- ✓ Facilita su separación del medio de reacción

- ✓ Incrementa la estabilidad de la enzima
- ✓ Posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo.
- ✓ Todos estos factores suelen generar un aumento de la productividad, lo que suele desembocar en un sistema económicamente rentable.

Como desventajas principales en el proceso de inmovilización se pueden presentar <sup>(17)</sup>:

- La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con diferente número de uniones al soporte.
- Pérdida de actividad de la enzima durante la movilización.
- Incremento de costos con respecto a la enzima nativa.

### **2.2.1. Métodos de inmovilización**

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todas las enzimas <sup>(18)</sup>. No obstante, la disponibilidad de la información en la actualidad, permite hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así, poder seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. La elección debe tener en cuenta las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de reactor a utilizar, el tipo de sustrato a ser procesado y otros factores <sup>(19)</sup>.

Entre los requerimientos que se deben de considerar el momento de seleccionar el método de inmovilización se tiene <sup>(17)</sup>:

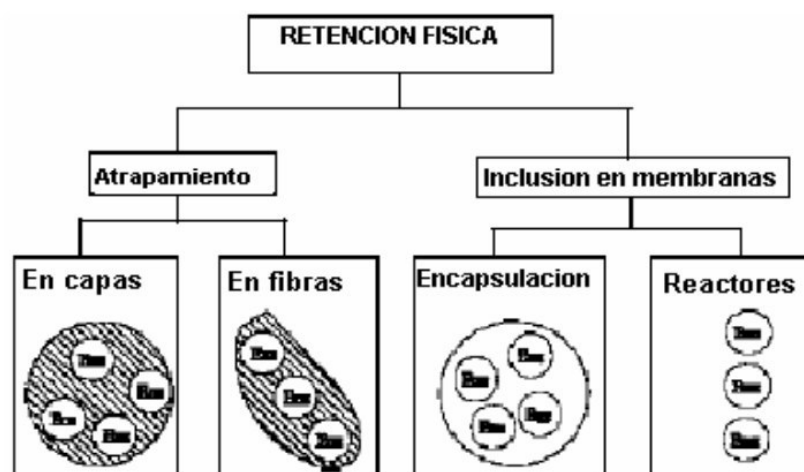


- Sencillo
- Reproducible
- Suave en las condiciones de reacción
- Económico
- Seguro
- Versátil
- Factible de escalado
- Buena congruencia geométrica entre la superficie del soporte y la enzima
- Elevada densidad de grupos activos por unidad de superficie en el soporte

Los principales protocolos de inmovilización clasifican a los métodos en 2 grupos: métodos físicos y químicos <sup>(17)</sup>.

#### 2.2.1.1.-Inmovilización por retención física

Este método representa modificaciones físicas del microentorno de la enzima tal y como su atrapamiento en la red espacial de una matriz polimérica o su inclusión en membranas. Un diagrama típico de esta clase de técnicas es mostrado en la figura 6.



**Figura 6. Métodos de inmovilización por retención física**

*Fuente.* Arroyo (1998)

**Atrapamiento.** Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros entrecruzables o polímeros de tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Posteriormente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles (poliacrilamida) o en fibras (acetato de celulosa), que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética.

El atrapamiento, es simple desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura ya que la enzima no está unida de ninguna forma y además se pueden obtener sistemas multienzimáticos<sup>(18)</sup>.

**Inclusión en membranas.** Se destacan dos técnicas tales como: el microencapsulado que consiste en atrapar la enzima en membranas poliméricas semipermeables esféricas y el reactor de membrana que consiste en confinar la enzima en una membrana que sirve de pared permeable selectiva al interior de un reactor.

En la microencapsulación las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes

(originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

Por otro lado los reactores de membrana, son sistemas que contienen enzimas, estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:

1. Mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana;
2. Por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana.

### **2.2.1.2.- Inmovilización por unión química**

La inmovilización por unión química se basan en las interacciones que puedan generarse entre el soporte y la enzima, ya sea por interacciones iónicas, por adsorción física, enlace covalente, quelación o unión metálica o los enlaces que se pueden generar entre enzimas como el reticulado (entrecruzamiento). En la figura 7 se presenta un diagrama típico de esta clase de técnicas.



**Figura 7. Métodos de inmovilización por unión química**  
*Fuente. Arroyo (1998)*

- **Unión a soportes.** Esta técnica implica la unión de una enzima a un soporte insoluble; siendo esta la más utilizada. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del sistema biocatalítico. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado <sup>(18,19)</sup>.

Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente

- **Adsorción iónica**

En la adsorción, la enzima se une a un soporte mediante interacciones iónicas de tipo fuerzas de Van de Waals, por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y otras.

El contacto de la solución acuosa de la enzima se puede realizar por procedimientos estáticos, electrodeposición, procesos en reactor o baño con agitación, siendo en esta última en la que se obtiene una deposición uniforme de la enzima.

Los principales factores que influyen en la adsorción implican el pH del medio ya que controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido, si la fuerza iónica aumenta se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína, el diámetro de poro juega un papel importante ya que debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima, la presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima incrementa la carga enzimática del derivado. Como principales ventajas implican

- Preparación sencilla
- Bajo costo
- No hay cambios de especificidad enzimática
- Los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua

Los inconvenientes de la adsorción son principalmente:

- La optimización de las variables que controlan la adsorción
- Los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico
- La unión al soporte es débil

- **Unión covalente**

La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, ácido aspártico y glutámico, el resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y no pueden intervenir en la unión covalente <sup>(17,18)</sup>.

Este método presenta las siguientes ventajas:

- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla.
- La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización.
- Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
- Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

En cambio la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes:

- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

- **Inmovilización por reticulación**

También denominado entrecruzamiento o crosslinking, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas, el método consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales (homobifuncionales o heteromultifuncionales) se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

El co-reticulado como una subdivisión alterna permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.

Actualmente, el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50 Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha utilizado en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos<sup>(3)</sup>.

Un resumen de algunas propiedades para las diferentes clases de Inmovilización se presenta a continuación (tabla 5), en la cual se diferencian varias características entre distintas técnicas de inmovilización.

**Tabla 5. Comparación entre distintas técnicas de inmovilización**

Propiedad	Enlace cruzado	Adsorción física	Enlace iónico	Quelación	Enlace covalente	Atrapamiento
Preparación	Intermedio	Simple	Simple	Simple	Difícil	Difícil
Fuerza del enlace	Fuerte	Débil	Intermedio	Intermedio	Fuerte	Fuerte
Actividad enzimática	Bajo	Intermedio	Alto	Alto	Alta	Bajo
Regeneración del soporte	Imposible	Posible	Posible	Intermedio	Alta	Intermedio
Costo de la inmovilización	Intermedio	Bajo	Bajo	Intermedio	Alta	Intermedio
Estabilidad	Alto	Bajo	Intermedio	Intermedio	Alta	alto
Protección de la enzima contra el ataque microbiano	Algunas veces	No	No	No	No	Si

*Fuente.*Arroyo (1998)

### 2.2.2. Efectos de la Inmovilización

La inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas, siendo significativamente diferente al de la enzima soluble, es así como efectos de índole conformacional, de partición o difusionales son los responsables de estas diferencias que pueden afectar la estabilidad y la actividad enzimática <sup>(18)</sup>.



Generalmente, se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización ya que la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte, hacen que la estructura terciaria de la enzima adquiera una mayor rigidez y se haga más resistente a la desactivación térmica o química; la protección frente a las proteasas cuando se unen al soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis; se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio y por último la alteración del microentorno ayuda a diferentes enzimas debido a la interacción de la enzima con el soporte, es por ello, si una enzima sensible al oxígeno (como las nitrogenasas, hidrogenasas, etc.) se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción, en otros casos el soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH <sup>(19)</sup>.

La actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse después de la inmovilización, por las siguientes razones:

- La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido, los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
- La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva o las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima <sup>(18)</sup>.

Por otro lado, existen efectos difusionales, electroestáticos o de microentorno que pueden originar cambios en la actividad. Los efectos difusionales se originan debido a

la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima, los cuales pueden estar impedida por resistencias de tipo externo como la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte que origina un gradiente de concentración a través de la zona de difusión y resistencias de tipo interno ya que los sustratos tienen que atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada, esto último se contrarresta en algunos casos disminuyendo el tamaño del sistema biocatalítico, aumentando la concentración de sustrato, incrementando la agitación o el flujo en el reactor<sup>(18)</sup>.

Los efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte, son importantes a tener en cuenta, de tal manera que, si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción. El Impedimento estérico o de tamaño de sustrato es otra de las variables importantes ya que en un principio, cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad, este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente. Este “efecto estérico” se puede evitar mediante una inmovilización covalente a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo<sup>(17)</sup>.

Por último los efectos en el microentorno tienen su efecto sobre la actividad enzimática ya que la enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente.

### **2.2.3. Soportes empleados en inmovilización de enzimas**

Son compuestos naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos juegan un papel primordial, en la inmovilización junto al método de inmovilización. Al considerar un

soporte para una enzima se deberá pensar en factores tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, la presión, agitación, la conjugación de cofactores y el proceso de separación del sustrato del producto <sup>(17,18)</sup>.

Los soportes pueden variar de forma (láminas, tubos, cilindros, esferas), tamaño, propiedades físicas o químicas, clasificándose según Arroyo <sup>(17)</sup> en:

1. **Soportes inorgánicos:** bentonita, piedra pómez, sílice, óxidos de metales, vidrio poroso y no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.
2. **Proteínas fibrosas:** colágeno, queratina, etc.
3. **Polímeros sintéticos:** Poliolefinas (como el poliestireno); polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.); Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).
4. **Hidrogel iónicos:** alginato, pectano, carraginan, etc.

Los polisacáridos que se han utilizados como soportes varían desde micro esferas a lechos de alginato, dextrano, carragenatos, agarosa, celulosa, quitosano, entre otros; todos ellos han sido utilizados con el fin de minimizar los problemas presentados en otras técnicas de atrapamiento como: a) baja eficiencia b) uso de solventes orgánicos volátiles que contribuyen a problemas ambientales c) uso de solventes orgánicos que pueden alterar la estructura y funcionalidad de las proteínas <sup>(18,19)</sup>.

#### 2.2.3.1. Características de los soportes para inmovilización

Aunque no existen soportes universales, se han descrito algunos principios para su selección dentro del proceso de aplicación a gran escala, entre ellos se tiene:

- (a) El material debe de estar disponible en abundancia y a un bajo precio

(b) El proceso de inmovilización tiene que ser simple y efectivo con la consideración de retención de la actividad enzimática

(c) La capacidad y eficiencia de las enzimas inmovilizadas tiene que ser alta

(d) El diseño del reactor con respecto al mecanismo manejado del biocatalizador tiene que ser simple

Además de lo anterior un soporte ideal para una aplicación dada es aquel que aumente la interacción con el sustrato, disminuya la inhibición por el producto, cambie el pH aparente óptimo hasta el valor deseado, frene el crecimiento microbiano y sea fácilmente recuperable para poder volverlo a utilizar. En la tabla 6 se presenta un resumen de los parámetros de importancia que se deben considerar en la inmovilización de enzimas.

**Tabla 6. Parámetros característicos para analizar enzimas inmovilizadas**

<b>Características</b>	<b>Parámetros de Importancia</b>
<b>Enzima</b>	<p><b>Propiedades bioquímicas:</b> Masa molecular, grupos funcionales en superficie de proteína, pureza.</p> <p><b>Parámetros cinéticos:</b> Actividad específica, perfiles de pH y temperatura, parámetros cinéticos de actividad e inhibición, perfiles de estabilidad vs pH y temperatura, solventes, contaminantes, impurezas</p>
<b>Soporte</b>	<p><b>Características químicas.</b> Bases químicas y composición, grupos funcionales, posibles cambios en su comportamiento, volumen accesibles de matriz, tamaño de poro, estabilidad química del soporte.</p> <p><b>Propiedades mecánicas.</b> diámetro de la partícula, resistencia al flujo , velocidad de sedimentación, abrasión</p>
<b>Enzima inmovilizada</b>	<p><b>Método de inmovilización.</b> Rendimiento de la enzima activa, atrapamiento de proteína, parámetros cinéticos intrínsecos.</p> <p><b>Efectos de transferencia de masa.</b> Diferentes concentraciones de solutos al interior y afuera de las partículas catalíticas. Difusión interna y externa.</p> <p><b>Estabilidad.</b> Estabilidad operacional y de almacenamiento.</p> <p><b>Rendimiento.</b> productividad.</p>

*Fuente.* Arroyo (1998)

### 2.2.4. Parámetros de inmovilización

Existen dos parámetros esenciales a considerar en un proceso de inmovilización: el rendimiento de inmovilización y la capacidad de carga del soporte <sup>(20)</sup>.

Se define el rendimiento de inmovilización como el porcentaje de la actividad original contactada que es expresada en el catalizador sólido. Esto es:

$$RI = \frac{EI}{EI + ER + EP} \times 100 = EI \times \frac{100}{ET}$$

Los valores de RI son muy variables, estimándose aceptables en general valores superiores al 40%. Generalmente los valores de RI para enzimas unidas por enlaces covalentes son menores que los obtenidos en otros métodos de inmovilización <sup>(20)</sup>.

Hay quienes prefieren expresar el valor de RI como:

$$RI = \frac{EI}{EI + EP} \times 100 = \frac{EI}{ET - ER}$$

Estos valores así obtenidos son mayores que los anteriores y toman en consideración el hecho de que, en principio, la enzima activa remanente en solución puede recuperarse sometiéndola a una nueva etapa de inmovilización.

La capacidad de carga se define como la actividad cargada por unidad de peso seco del soporte. Algunos autores la definen simplemente como proteína total cargada (diferencia entre proteína total contactada y proteína total remanente en solución) por unidad de peso seco en el soporte, la capacidad de carga también ha sido definida como la actividad cargada expresada en el catalizador por unidad de peso seco de soporte.

$$CC = \frac{EI}{W}$$

Donde:

RI = Rendimiento de inmovilización

EI = Actividad enzimática inmovilizada

EP = Actividad enzimática perdida

ET = Actividad enzimática total contactada en el proceso de inmovilización

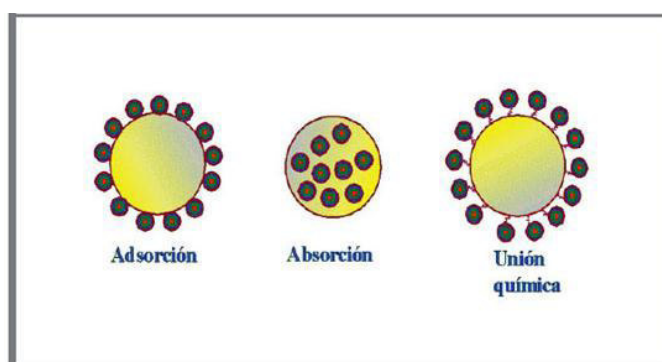
ER = Actividad enzimática residual en solución

CC = Capacidad de carga del soporte

W = Peso de soporte

### 2.3.- Inmovilización de lipasa

Los principios de inmovilización de enzimas también son aplicados a las lipasas, debido a su importancia industrial, a lo largo de estos años se han empleado diversos soportes y métodos, como los de adsorción, inclusión, enlace covalente empleando tanto soportes hidrofílicos como hidrofóbicos, algunas de estas investigaciones se resumen en la tabla 7 y figura 8.



**Figura 8. Procedimientos para inmovilizar enzimas**

*Fuente.* Cifuentes (2006)

**Tabla 7. métodos y soportes empleados en la inmovilización de lipasas**

Fuente	Soporte	Método	Referencia
<i>Candida cylindracea</i>	Alginato de sodio	Atrapamiento	Hertzberg y col 1992
<i>C. antártica</i>	Resina acrílica	Enlanzamiento iónico	Claon y Akoh, 1994
<i>Rhizopus javanicus</i>	Fibra hueca	Adsorción	Bouewer y col, 1997
<i>C. antártica</i> <i>Mucor mihei</i>	Resina acrílica Duolite	Adsorción	De castro y Gago, 1998
<i>Pseudomonas</i> <i>Fluorescens</i>	Vidrio poroso	Adsorción	Lee y Swaisgood, 1998
<i>C. rugosa</i>	Zeolite	Adsorción	Knezevic y col, 1998
<i>C. rugosa</i>	Polipropileno	Adsorción física	López y col, 2001
<i>C. antártica</i> A,B,C <i>Rugosa</i> , <i>Rhizomucor</i> <i>mihei</i> , <i>Rhizopus orizae</i>	Sulfato-dextrana-manae- agarosa-Cl 4B	Enlanzamiento iónico	Fuentes y col, 2004
<i>Artrhobacter sp.</i>	Materiales hidrofóbicos sol-gel	Encapsulación	Yang y col 2009
<i>Thermomyces</i> <i>laguginosa</i>	Glutaraldehido	Entrecruzamiento	Gupta y khane, 2009

Fuente:González-Bacerio (2010)

Entre los diferentes soportes para inmovilizar lipasas, se consideran algunos productos naturales que ofrecen la ventaja de bajos costos como son la cáscara de arroz, quitina, chitosan, celulosa, la factibilidad de emplear chitosan como matriz para inmovilizar lipasas microbianas ha sido demostrada en diferentes estudios. Así Pereyra y col <sup>(21)</sup>, demostraron que los poros del chitosan presentan una favorable configuración para inmovilizar la lipasa proveniente de *Candida rugosa*, logrando mantener la conformación de la enzima y el sitio activo, con buena actividad en reacciones de esterificación de butanol con ácido butírico.

Sánchez Ferrer, <sup>(22)</sup> presenta un análisis exhaustivo de las diferentes publicaciones realizadas en la inmovilización de lipasas hasta 1999, en cuanto a técnicas y soportes empleados, entre los hallazgos más relevantes reportados por el autor se encuentran:

- El método más empleado resulto ser la adsorción sobre diferentes soportes. Esta técnica se caracteriza por ser sencilla e implica poner en contacto la solución de lipasa que se quiere inmovilizar con el soporte y dejar un tiempo de contacto que varía de 1 a 24 horas, en las condiciones adecuadas (ligera agitación, baja temperatura a un pH cercano al óptimo hasta alcanzar el equilibrio de adsorción). Por otro lado, los métodos covalentes también fueron reportados pero empleados en menor medida, así como los de inclusión o cross linking. Estos métodos incluyen un pre tratamiento del soporte y suelen provocar pérdidas o cambios importantes en la actividad enzimática.
- La inmovilización de lipasas suele suponer una mejora en la estabilidad de la enzima, aunque también puede cambiar propiedades como los óptimos de pH y temperatura, en algunos casos con influencia sobre la enantioselectividad.
- El efecto de la reutilización de lipasas inmovilizadas no fueron reportados en la mayoría de los trabajos estudiados, en general se puede concluir que las lipasas pueden reutilizarse sin tratamientos muy complejos, normalmente tan simples como una operación de lavado y secado.
- Las lipasas inmovilizadas con los diferentes métodos pueden emplearse en una variedad de reacciones tanto de hidrólisis como de síntesis, así como en todo tipo de medios, acuosos, orgánicos y bifásicos.
- Las técnicas de inmovilización se han aplicado mayoritariamente a lipasas provenientes de diversos microorganismos y en menor proporción a las obtenidas de porcino.



- Entre todas las lipasas estudiadas que se han inmovilizado destacan las siguientes:
  - ✓ *Candida rugosa*, se compra de forma libre y se inmoviliza en distintos soportes.
  - ✓ *Mucor mihei*. Distribuida por Novo nordisk, es una lipasa inmovilizada en Duolite A 568.
  - ✓ *Candida Antártica*. También comercializada por Novo nordisk con el nombre de Novozyme ® 435, ya viene inmovilizada en una resina acrílica.

En la actualidad existe un creciente interés por el empleo de lipasas en medios orgánicos, principalmente en reacciones de síntesis orgánica <sup>(23,24)</sup>, donde es recomendable la inmovilización por los efectos inhibitorios de los solventes orgánicos, la inmovilización provee una técnica de fácil separación de la enzima del medio de reacción con lo cual se disminuyen los costos.

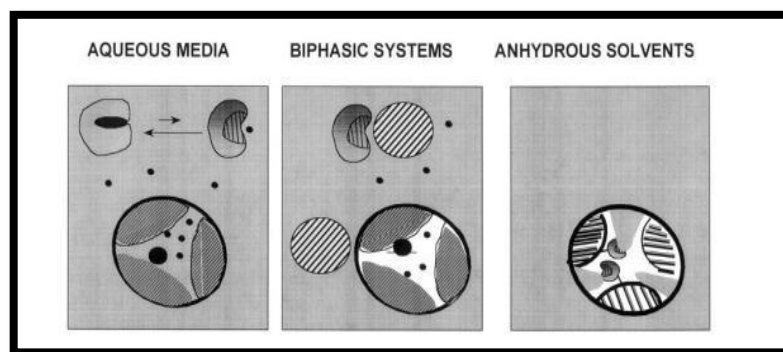
Jonzo y col <sup>(23)</sup>, emplearon las resinas de Duolite A 568 y Amberlite IRC 50, para inmovilizar a la lipasa de *Candida rugosa*, con la finalidad de aplicar esta técnica a la producción de colesterol en medio orgánico, esta estrategia permitió incrementar hasta en un 10 % la síntesis del oleato de colesterol.

La adsorción interfacial es otra de las técnicas más empleadas, la cual se lleva a cabo en soportes hidrofóbicos donde las lipasas son adsorbidas por una combinación de fuerzas de Van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas <sup>(25)</sup>. Este método se fundamenta en la propiedad altamente hidrofóbica que se encuentra alrededor del sitio catalítico de la lipasa y que precisamente está involucrado durante las interacciones preferenciales de la lipasa con superficies solidas fuertemente hidrofóbicas. Este mecanismo ha sido empleado para adsorber a las lipasas a soportes hidrofóbicos que involucran al sitio

catalítico de tal manera que la adsorción al soporte se encuentren relacionados con activación interfacial <sup>(26)</sup>.

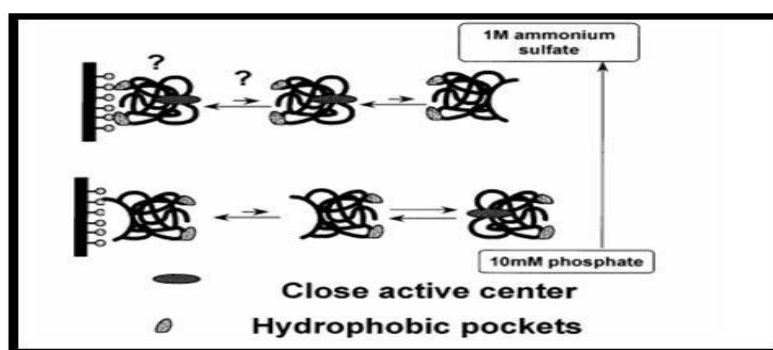
### 2.3.1. Inmovilización de lipasa en soportes hidrofóbicos

Uno de los protocolos de inmovilización más difundidos para las lipasas es la adsorción selectiva sobre soportes con cierto grado de hidrofobicidad <sup>(26)</sup>. Según la propuesta de Bastida <sup>(27)</sup>, los soportes hidrofóbicos mimetizan las interfaces formadas por los sustratos naturales de las lipasas, por lo que estas enzimas se adsorben fuertemente sobre ellos en una forma abierta e hiperactivada, involucrando la zona de contacto lipídico, como se puede observar en las figuras 9 y 10.



**Figura 9. Actividades lipasa/estearasa de lipasa soluble e inmovilizada**

Fuente. Guisan (2006)



**Figura 10. Adsorción de lipasa a soportes hidrofóbicos**

Fuente. Fernández-La fuente

Esta interacción no es un efecto de asociaciones hidrofóbicas, ya que se produce a fuerzas iónicas bajas <sup>(25, 26,27)</sup> y las lipasas son proteínas muy hidrofílicas <sup>(26)</sup>. Por tanto, este es un mecanismo de adsorción interfacial, basado en la activación interfacial y propia solo de proteínas con actividad superficial como las lipasas.

Entre las bondades que presenta el método de inmovilización por adsorción interfacial pueden citarse la sencillez de la técnica, la ausencia de reactivos caros y tóxicos, la capacidad para retener o incrementar la actividad específica <sup>(25,26)</sup>, la potenciación de la estereoselectividad de la lipasa <sup>(24,25)</sup>, y la posibilidad de recuperar el soporte, debido a la reversibilidad parcial de las interacciones. Además, Fernández- La Fuente <sup>(26)</sup>, ha reportado como beneficios después de la inmovilización la hiperactivación de la enzima, la purificación a bajas fuerzas iónicas partiendo de extractos crudos y el incremento de la enantioselectividad.

Entre los soportes más utilizados para estos fines se encuentran aquellos basados en la activación de la agarosa con grupos hidrofóbicos como butilo, fenilo y octilo <sup>(26,28,29)</sup>. La fortaleza de la adsorción de las lipasas sobre octil-agarosa es de tal magnitud, que se requieren altas concentraciones de detergente, urea o guanidina para romper las interacciones <sup>(26)</sup>.

Bastida y col <sup>(6)</sup>, emplearon la técnica de inmovilización en soporte hidrófobico empleando geles de octil - agarosa para inmovilizar las lipasas de *Candida antarctica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor javanicus*, y *Rhizopus niveus*. Las lipasas inmovilizadas demostraron hiperactivación, en el caso de *R. niveus*, *M.miehei*, y *H. lanuginosa* fueron 6,7 y 20 veces más activas en la hidrólisis de sustratos hidrofílicos que sus correspondientes enzimas solubles. También

demostraron cambios en la estereoespecificidad en la hidrólisis de esteres quirales, los resultados demostraron que las lipasas de diferentes microorganismos son adsorbidas a bajas fuerzas iónicas y en soportes fuertemente hidrofóbicos

Palomo y col <sup>(30)</sup> emplearon como soporte hidrofóbico el Octadecilo-Sepabeads, para inmovilizar las lipasas de *Mucor miehei*, *Candida rugosa* y la fracción B de *Candida antarctica*, la actividad y estabilidad de las enzimas inmovilizadas por esta estrategia fueron comparadas con la técnica de inmovilización por multipuntos covalentes. La enzima inmovilizada en el soporte hidrofóbico demostró mayor actividad que la enzima libre, en el caso de la lipasa de *Mucor miehei* presentó 20 veces mayor actividad que la enzima libre, además la estabilidad se mantuvo al 100 % después de 200 h de incubación a 50 °C y pH 7,0 resultando ser más estables frente a la técnica de inmovilización por multipuntos que presentan a la enzima inmovilizada en su forma cerrada.

Cunha A y col <sup>(29)</sup>, emplearon la técnica de inmovilización por adsorción hidrofóbica, para inmovilizar un grupo de lipasas producidas por el hongo *Penicillium simplissimum*. Logrando separar tres fracciones de las lipasas empleando la adsorción secuencial en diferentes soportes (butilo, fenilo, y octil-agarosa) y a baja fuerza iónicas, los resultados demostraron que la adsorción secuencial fue una estrategia eficiente para obtener nuevos biocatalizadores con diferentes grados de enantioselectividad, termoestabilidad y especificidad, a partir de un extracto crudo además de ser una tecnología de bajo costo.

### **2.3.2. Soporte hidrofóbico “Sepabead”**

Las resinas hidrofóbicas de la serie “Sepabead EC”, son producidas por Resindiom S.R.L Mitsubishi Chemical Corporation, <sup>(7)</sup>, como soportes de enzimas para




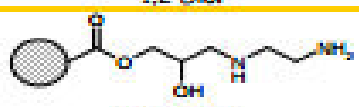
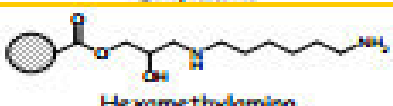
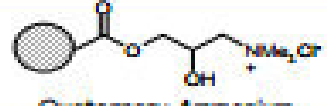
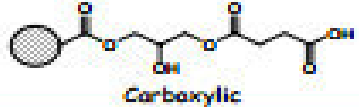
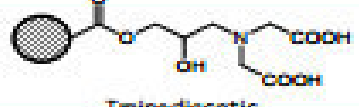

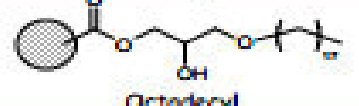
las industrias biotecnológicas en la aplicación de una serie de procesos que resulten amigables con el medio ambiente.

Las características que presentan estas resinas son:

- Estabilidad química y física, ya que los polímeros no son degradados por microorganismos.
- Elevada capacidad de unión a la proteína
- Morfología interna estable en agua y solventes orgánicos
- Disponibles en diferentes rangos de tamaño y grados de porosidad

El soporte Octadecilo-sepabead (OD-403) está formado por una matriz polimérica de metacrilico con un diámetro de poro entre 10 – 20 nm.

Estos soportes son empleados con diferentes enzimas y técnicas, a continuación se presenta la lista de la línea sepabead (figura 11)

Product Name	Functional Group	Functional Group Density
SEPABEADS® EC-EP	 Epoxy	min. 110 $\mu\text{mol/g}$ wet
SEPABEADS® EC-HFA	 Amino-Epoxy	min. 50 $\mu\text{mol/g}$ wet
SEPABEADS® EC-HG	 1,2 Diol	-
SEPABEADS® EC-EA	 Ethylamino	min. 0,6 mmol/g wet
SEPABEADS® EC-HA	 Hexamethylamino	min. 0,7 mmol/g wet
SEPABEADS® EC-QA	 Quaternary Ammonium	min. 0,2 mmol/g wet
SEPABEADS® EC-CM	 Carboxylic	min. 0,1 mmol/g wet
SEPABEADS® EC-IDA	 Iminediacetic	min. 50 $\mu\text{mol Ni}^{++}/\text{g}$ wet
SEPABEADS® EC-BU	 Butyl	-
SEPABEADS® EC-OD	 Octadecyl	-

**Figura 11.** Línea de Productos Sepabead.

Fuente .Resindion

### 2.3.3.- Lipasas producidas por el género *Marinobacter*

Este género fue introducido por Gauthier y col <sup>(31)</sup>, quienes lo clasificaron dentro del phylum Proteobacteria; clase Gammaproteobacteria; orden Alteromonadales y familia Alteromonadaceae, a la fecha se han descrito 30 especies, de las cuales las especies de *Marinobacter lipolyticus* y *M. hydrocarbonoclasticus* han sido estudiadas por presentar producción de lipasas extracelulares <sup>(32 y 34)</sup>

*Marinobacter lipolyticus* fue aislada en el 2003, al sur de España por Martín y col <sup>(32)</sup>, durante un screening en hábitats hipersalinos de bacterias halófilas productoras de enzimas extracelulares, esta fue clasificada como una nueva especie de bacteria halófila moderada con crecimiento óptimo en NaCl entre 5,0 – 7,0 %. Además, presentó actividad lipolítica tanto en ésteres de ácidos grasos de cadena corta como para-nitrofenil-caprilato y en ésteres de cadena larga como pNP- palmitato y estearato donde se reportaron menores actividades. En el 2011, Pérez y col <sup>(33)</sup>, lograron aislar y purificar, la lipasa designada como Lip BL por expresión en *Escherichia coli*, La enzima fue caracterizada bioquímicamente como una proteína de 404 aminoácidos y 45,3 kDa, la temperatura para la actividad máxima se reportó en 80 °C y el pH óptimo fue de 7,0 a 25 °C, además la actividad máxima se dio en ausencia de cloruro de sodio, manteniendo el 20% de la actividad en un amplio rango de cloruro de sodio. Lip BL hidrolizó aceite de oliva y de pescado, además para conferir estabilidad a la enzima los investigadores inmovilizaron Lip BL en diferentes soportes

*Marinobacter aquaeolei*, hoy reclasificada como *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* fue aislada por Lee y col <sup>(34)</sup> quienes realizaron un estudio metagenómico para identificar lipasas a partir de sedimentos de suelos marinos. En este estudio se logró seleccionar un hipotético gen de una nueva lipasa, que se encontraría presente en 24 especies

microbianas presentes en la metagenoteca, El gen de interés fue denominado lipG, el cual fue amplificado, clonado y expresado en *E. coli* BL21(DE3). La lipasa extracelular caracterizada presentó actividad sobre ésteres de para-nitrofenil tales como acetato, propionato, butirato, caproato, caprilato, caprato, laurato, miristato, palmitato y estearato.

### **2.3.4.- Aplicaciones industriales de las lipasas inmovilizadas**

#### **2.3.4.1. Industria de alimentos**

Las lipasas están siendo aplicadas en la modificación de grasas y aceites, es una de las áreas principales en la industria de procesamiento de alimentos. Los triglicéridos estructurados que se pueden obtener a partir de aceites vegetales de bajo costo, son un claro ejemplo de como las lipasas pueden ser aprovechadas para elevar el valor nutritivo de los aceites. Las lipasas microbianas que presentan elevada regioselectividad por ácidos grasos específicos son las empleadas en la producción de estos lípidos estructurados. Además por este mismo procedimiento se podrían obtener sustitutos de la manteca de cacao, triglicéridos de bajas calorías y ricos en ácido oleico <sup>(10, 13)</sup>.

Las lipasas también se emplean en el procesamiento del té negro, junto a la deshidratación, ruptura mecánica, la fermentación enzimática es un punto clave para iniciar la hidrólisis de los lípidos de membrana responsables de la formación de productos volátiles que proporcionan el sabor característico del té, en este caso se está empleando a la Lipasa de *Rhizomucor miehei* para incrementar los niveles de ácidos grasos poliinsaturados.



#### 2.3.4.2. Resolución de mezclas racémicas

La resolución vía hidrólisis, síntesis y transesterificación, de productos finales o intermediarios de la industria farmacéutica y agroquímica se ve incrementada en estos últimos años tanto en la investigación académica como en la industrial, debido a que la quiralidad es un factor clave en la eficacia de muchos medicamentos. Actualmente las normativas de legislación en las que se tiende a exigir productos óptimamente puros en lugar de mezclas racémicas están provocando un gran esfuerzo de investigación en el campo de las lipasas como biocatalizadores enantioméricamente activos <sup>(35)</sup>.

La lipasa de *C. antarctica* (Novozyme (R) 435) ha sido empleada en la resolución de la mezcla racémica del flurbiprofeno por el método de esterificación enantioselectiva con alcoholes <sup>(36)</sup>. Del mismo modo la Lipase de *C. cylindracea* se empleó en la resolución de la mezcla racémica del Baclofeno, que es químicamente (RS)- beta-(aminomethyl)-4-chloro-benzene ácido propanoico. Muralidhar <sup>(37)</sup>. La resolución enzimática de la mezcla racémica de 2-pentanol y 2-heptanol por lipasa B de *C. Antarctica* fue demostrada, el producto obtenido fue el S-(+)-2-pentanol, un intermediario quiral clave en la síntesis de medicamentos anti- Alzheimer.

#### 2.3.4.3. Aplicaciones médicas

Las lipasas son empleadas en la producción de productos farmacéuticos: Berrobi y col <sup>(38)</sup>, consiguieron la patente para una preparación farmacéutica que contiene hialuronidasa / tiomucasa y lipasas que son empleada en la inflamación de piel.

La lipasa de *Candida rugosa*, es empleada en la síntesis lovastatina, empleado como hipolipemiente. La hidrólisis asimétrica del éster del ácido 3-fenil glicídico, es un

intermediario en la síntesis de diltiazem hydrochlorado, empleado como vasodilatador coronario, producido por la lipasa de *S. marcescens* <sup>(39)</sup>

#### **2.3.4.4. Lipasas como biosensores**

Los estudios demuestran que las lipasas pueden ser inmovilizadas en electrodos conteniendo adecuados niveles pH y oxígeno en combinación con la glucosa oxidasa, esta función como lípido biosensor es aplicada en la determinación de triglicéridos y colesterol <sup>(40)</sup>.

Los biosensores empleando lipasas de hongos para la detección de hibridaciones específicas de ácidos nucleicos complementarios han demostrado ser uno de los métodos más prácticos por su capacidad hidrolítica <sup>(41)</sup>.

#### **2.3.4.5. Tratamiento de efluentes y aguas residuales**

Las lipasas bacterianas están involucradas en la solución de los problemas ambientales como es la remoción de las grasas de los desagües domésticos y en los digestores anaeróbicos. La primera etapa en la degradación y el reciclaje de lodos y de aguas residuales primarias es la solubilización y la hidrólisis incrementada de estructuras orgánicas poliméricas, la digestión anaeróbica finalmente conseguirá la obtención de estructuras de bajo peso molecular en presencia de enzimas extracelulares, para este propósito se emplean una mezcla de enzimas que actuarán simultáneamente (proteasas, lipasas y glucosidasas) <sup>(42)</sup>

#### **2.3.4.6. Uso de lipasas en la producción de biodiesel**

Las fuentes limitadas de combustibles fósiles, los precios elevados del petróleo crudo, y las consecuencias para el medio ambiente son razones que han sido fundamentadas para

la búsqueda de nuevas alternativas en la producción de biocombustibles. La producción de biodiesel a partir de aceites vegetales es una de las alternativas viables demostrada por el elevado número de investigaciones <sup>(43)</sup>.

La lipasa inmovilizada de *P. cepacia*, ha sido empleada en las reacciones de transesterificación del aceite de soya con metanol y etanol. Los esteres grasos también han sido obtenidos a partir de aceite de castor usando n-hexano como solvente y dos lipasas comerciales, Novozym 435 y Lipozyme IM, Novozyme 435 también ha sido empleada en la transesterificación de aceite de soya para la producción de biodiesel en un medio libre de solvente <sup>(44)</sup>.

Actualmente, las investigaciones buscan emplear residuos de grasas que son vertidas al medio ambiente para la obtención del biodiesel como son los aceites y mantecas del desecho de los restaurantes, Hsu AF y col<sup>(45)</sup>, demostraron la producción de alquil esteres de las grasas de restaurantes empleando la lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosa*

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- Obtención del crudo enzimático

Se empleó *Marinobacter sp CH27*, bacteria Gram negativa aislada de las salinas de Pilluana, Departamento de San Martín<sup>(8)</sup>, dicha bacteria es parte del cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

*Marinobacter sp CH27* fue cultivada en agua de sales (SW) conteniendo 5% de cloruro de sodio, la composición de dicho medio se describe en el Anexo 1. El medio SW fue suplementado según lo descrito por Alejandro-P<sup>(46)</sup>, con extracto de levadura al 0,5 g / L (fuente de nitrógeno), aceite de oliva al 1% (inductor de la producción de lipasa) y Triton X-100 al 0,1% (emulgente). *Marinobacter sp CH27*, se inoculó a una concentración del 5% en frascos erlenmeyer de 1 L. Primero se realizó un pre-inoculo en el medio de cultivo antes descrito, luego se añadió 5 mL del inoculo a 95 mL del medio contenido en un frasco erlemeyer de 1 L. Finalmente se incubo en un baño de agua con agitación a 200 rpm y 37 °C durante 8 horas. Después, las células se separaron por centrifugación a 5000 rpm por 10 min, empleando una centrifuga refrigerada, el sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo, el mismo que fue filtrado

secuencialmente a través de filtros de 0,45 mm y 0,22 mm. Después fue concentrado 5 veces (5X) usando un sistema de ultrafiltración tangencial (Millipore, Eschborn, Federal Republic of Germany) con una membrana de corte molecular de 10 kDa, la filtración y ultrafiltración se realizaron a 10 °C. La solución concentrada fue dializada con agua destilada estéril durante 8 horas, antes de su uso.

### 3.2.- Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la lipasa libre e inmovilizada se realizó empleando como sustrato para – nitrofenil palmitato (Sigma) siguiendo la metodología propuesta por Gupta y col 2003<sup>(10)</sup>, con las siguientes modificaciones, se disolvió 16 mg de p-nitrofenol palmitato (p-NPP) en isopropanol 1.0 mL, Triton X-100, 0,1 mL, y 9 ml de buffer fosfato 0.025M pH 7, 0; esta mezcla constituyo la solución de trabajo. Para la determinación de la actividad enzimática se emplearon 1,75 mL de la solución de trabajo y 0,25 mL del extracto crudo, conteniendo la lipasa, la mezcla se incubó por 20 min a 37 °C. La actividad de la lipasa fue medida por incremento de la absorbancia a 410 nm, producida por la liberación de p- nitrofenol a partir de la hidrólisis de pNPP. La actividad enzimática fue expresada como actividad específica en U/ mg de proteína. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de p-nitrofenol en un minuto.

La actividad enzimática fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática } (\mu\text{mol/min} \times \text{ml}) = \frac{1}{\epsilon} \times \frac{\text{ABS}}{\text{min}} \times \frac{V_{rx}}{V_{enz}} \quad (1)$$

Donde:

- $\epsilon$  : 0,7351 Abs x mL / µmoles x cm
- $V_{rx}$  : volumen de reacción
- $V_{enz}$  : volumen de enzima empleado

La curva estándar del p-nitrofenol se preparó en el rango de 0,125 a 1,25  $\mu\text{mol/mL}$ , para lo cual se diluyó el estándar en solución buffer fosfato 25 mM, pH7,0, las absorbancias se leyeron a 410 nm y se graficó la curva de concentraciones de para-nitrofenol versus sus respectivas absorbancias (Anexo 2).

### **3.3.- Determinación de proteínas totales por el método de Bradford**

Para las diferentes determinaciones de proteínas totales se trabajó con el reactivo de Bradford siguiendo la metodología propuesta por Amresco. Se construyó la curva de calibración empleando como proteína estándar albumina sérica bovina (BSA) de Amresco, en el rango de 100 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de cada estándar previamente diluido con agua destilada a las concentraciones de 125, 250, 500, 750 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ , y luego se les agregó 1 mL del reactivo de Bradford, se dejaron en reposo por 10 min a temperatura ambiente, las soluciones contenidas en cada uno de los tubos de reacción fueron transferidas a cubetas y se leyeron las absorbancias de los estándares versus el blanco a 595 nm en el espectrofotómetro Génesis 10 uv. La curva estándar fue construida graficando las concentraciones de BSA ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus sus respectivas absorbancias (Anexo 3). Para la determinación de proteínas totales en el extracto crudo se procedió de la misma manera tomando 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras a analizar.

### **3.4. Caracterización bioquímica de la lipasa**

#### **3.4.1.- Determinación de los factores que afectan la actividad enzimática**

Se determinaron el efecto de la temperatura, pH, tiempo, concentraciones de cloruro de sodio y calcio sobre la actividad enzimática del extracto crudo, para lo cual se

empleó el Diseño Estadístico Experimental (DEE) Box-Behnken, empleando la Metodología de Superficie Respuesta (MRS), para analizar 5 variables a tres niveles, se obtuvo el diseño experimental, con un total de 40 experimentos y 6 réplicas en el punto central (Anexo 4). Las variables y sus niveles seleccionados fueron: pH (4,0 – 9,0), temperatura (32,5- 45,0 °C), tiempo (0,0 – 40,0 min), concentración de NaCl (0,0 – 10,0 %) y concentración de CaCl<sub>2</sub> (0,0 – 1,0%).

### **3.4.2.- Determinación de los parámetros cinéticos**

Se determinó la Actividad de hidrólisis del p-NPP en las condiciones óptimas de pH y temperatura (7.0 y 37°C) variando las concentraciones de pNPP en el rango de 0,0 – 0,6 mM. La constante de Michaelis-Menten y la Velocidad máxima fueron determinadas a partir de la curva de dobles recíprocos.

Para el estudio de la variable pH se prepararon diferentes soluciones tampón, pH 4,0 (tampón acetato), pH 7,0 (tampón fosfato), pH 9,0 (tampón bicarbonato), la concentración de todas las soluciones tampón fue de 25 mM. La actividad enzimática se determinó según el procedimiento 2 antes descrito remplazando el buffer fosfato con los buffer a los pH indicados y luego construyendo las respectivas curvas estándar de p-nitrofenol empleando cada uno de las soluciones tampón (Anexo 5).

### **3.5.- Inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27 en soporte octadecilo sepabead**

Se empleó el soporte octadecilo - sepabead (Sepabead EC-OD), donado por Resindion S.R.L. Previo a la inmovilización se hidrató el soporte, para lo cual se pesó 0,1 g del soporte Octadecilo Sepabead que fue lavado 5 veces con agua destilada estéril,

se dejó hidratando con el buffer fosfato 5 mM pH 7,0 durante 24 horas a 10 °C, este procedimiento fue adaptado, para los ensayos de optimización de la variable pH, para lo cual el soporte fue hidratado con el pH respectivo.

Se determinó la concentración de proteínas totales en el extracto crudo, según lo descrito en el apartado 3.3 y se diluyo para obtener la concentración de 15 mg de proteínas por gramo de soporte seco con el tampón respectivo. Esta muestra diluida fue puesta en contacto con el soporte hidratado y fueron mezclados suavemente con agitadores magnéticos en cruz, a 10 °C.

La eficiencia de la inmovilización fue calculada en términos de actividad de lipasa, actividad específica, rendimiento de proteína cargada, con las siguientes fórmulas:

$$\text{Actividad específica (U / mg proteína)} = \frac{\text{Actividad de lipasa inmovilizada}}{\text{Cantidad de proteína cargada}} \quad (2)$$

$$\text{Actividad lipasa (U/g soporte)} = \frac{\text{Actividad de lipasa inmovilizada}}{\text{g soporte}} \quad (3)$$

$$\text{Porcentaje de proteína cargada (\%)} = \frac{\text{Cantidad de proteína cargada} \times 100}{\text{Cantidad de proteína contactada}} \quad (4)$$

$$\text{Rendimiento de inmovilización (\%)} = \frac{\text{Act. Esp. de lipasa inmovilizada} \times 100}{\text{Act. Esp. de lipasa libre}} \quad (5)$$

### 3.5.1- Determinación de los factores que influyen en la inmovilización

Con la finalidad de optimizar la inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter sp CH27* se empleó el Diseño Estadístico factorial, Box-Behnken, empleando la Metodología de Superficie Respuesta (MRS), a 3 niveles y 3 factores , requiriendo un total de 12 experimentos y 3 réplicas en el punto central. El diseño experimental se muestra en la tabla 8. Las variables y sus niveles seleccionados fueron: fuerza iónica (2,5, 5,0 y 10,0 mM), tiempo (30, 60 y 120 min) y pH (6,0; 7,0 y 8,0),



Para este análisis se emplearon soluciones de tampón fosfato para obtener el pH correspondiente.

**Tabla 8. Diseño estadístico experimental Box- Behnken de superficie respuesta a 3 niveles y 3 factores (\*) para la inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter sp.***

Experimentos	pH	Tiempo	Fza Iónica
1	8	60	2.5
2	6	30	5.0
3	7	30	2.5
4	8	30	5.0
5	6	60	10.0
6	6	120	5.0
7	7	120	2.5
8	8	60	10.0
9	6	60	2.5
10	7	30	10.0
11	8	120	5.0
12	7	120	10.0
13	7	60	5.0
14	7	60	5.0
15	7	60	5.0

\*El diseño fue realizado empleando el programa estadístico Minitab 16.

Las diferentes variaciones de fuerza iónica fueron obtenidas variando las concentraciones del buffer fosfato, para lo cual se empleó la siguiente ecuación:

$$I = (1/2) \sum z^2 [i]$$

La proteína contactada al soporte fue de 15 mg de proteína total / g soporte y la inmovilización para cada experimento se realizó según lo descrito en el punto 3.5.1. al terminar cada experimento, inmediatamente se separaron las fracciones inmovilizadas y

la solución por filtración a 5000 rpm por 10 min, empleando una centrifuga refrigerada, la solución fue empleada para realizar el análisis de proteínas residuales y las fracciones inmovilizadas fueron lavadas 5 veces con el tampón correspondiente al ensayo, esta fracción fue empleada para determinar la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada los resultados fueron expresados en actividad enzimática por gramo de soporte (U/ g soporte).

### **3.6. Efecto de la temperatura y pH en la actividad de la enzima inmovilizada**

Se inmovilizó la enzima, empleando las condiciones óptimas de inmovilización que fueron determinadas en el experimento 3.5. Después de la inmovilización el soporte fue lavado 5 veces con tampón fosfato, pH 7,0 y re suspendido en 15 mL del mismo buffer.

Se evaluaron los efectos de temperatura y pH, sobre la actividad de la enzima inmovilizada, para lo cual se empleó el diseño compuesto central a dos factores y 3 niveles, resultando un total de 8 experimentos y dos repeticiones en el punto central empleando el programa Minitab 16 (tabla 9). Las variables y sus niveles seleccionados fueron: pH 5,0 a 9,0), temperatura 10,0 a 50,0 °C).

**Tabla 9. Efecto de la temperatura y el pH en la actividad de la enzima inmovilizada de *Marinobacter sp* CH27, mediante el diseño compuesto central de superficie respuesta a 2 factores y 3 niveles (\*).**

Experimento	pH	Temperatura
1	5	10
2	9	50
3	5	50
4	7	40
5	7	20
6	9	10
7	7	30
8	7	30
9	8	30
10	6	30

\*El diseño fue realizado empleando el programa estadístico Minitab 16

Las actividades enzimáticas fueron ensayadas según lo descrito en el procedimiento 3.2 empleando las siguientes soluciones tampón: acetato (pH 5,0); fosfato (pH 6,0 y 7,0); bicarbonato (pH 8,0 y 9,0) a las concentraciones de 25 mM, para preparar la solución de trabajo.

### **3.7.- Termoestabilidad de la lipasa inmovilizada**

Para determinar la estabilidad de la lipasa inmovilizada en el soporte octadecilo-sepabead, se procedió a incubar la suspensión de enzima inmovilizada a 40 y 50 °C respectivamente, se colectaron 250 µL de dicha muestra a los siguientes tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 24 horas, con la finalidad de medir las actividades residuales en la

hidrólisis del p-NPP en buffer fosfato 25 mM pH 7,0 y a temperatura de 37 °C, paralelamente se trabajó de la misma manera con el extracto crudo (lipasa libre) .

### 3.8.- Análisis Estadístico

Los resultados experimentales obtenidos de los diseños planteados se analizaron por la metodología de superficie respuesta empleando el programa estadístico MINITAB 16. La optimización de la inmovilización se realizó siguiendo el modelo matemático polinomial de segundo orden. Ecuación (6)

$$Y_{yield} = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^4 b_{ij} X_i X_j \quad (6)$$

Donde Y es la respuesta,  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$  y  $b_{ij}$  son coeficientes de regresión para los términos linear, cuadrático y de intersección respectivamente y  $X_i$ ,  $X_i^2$ ,  $X_i X_j$  son las variables independientes.

## **4.- RESULTADOS**

En el presente estudio se trabajó con el extracto crudo producido por *Marinobacter sp CH27* el mismo que fue concentrado 5 veces y dializado antes de ser empleado. Se determinaron las características bioquímicas del extracto crudo conteniendo la lipasa soluble, donde se consideraron los efectos de la temperatura, pH, tiempo, efecto de la concentración de cloruro de sodio y calcio. Luego se inmovilizó la lipasa y se determinaron sus parámetros cinéticos y termoestabilidad.

### **4.1.-Caracterización de la lipasa producida por *Marinobacter sp***

#### **4.1.1.- Factores que afectan la actividad enzimática de la lipasa**

En la tabla 10, se presentan los resultados de los 46 experimentos, las variables y sus valores seleccionados fueron: pH (4,0; 7,0 y 9,0), temperatura (5,0; 32,5 y 45,0 °C), tiempo (0, 20 y 40 min), concentración de NaCl (0,0; 5,0 y 10,0 %), y concentración de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  (0,0; 0,05 y 0,1 %).

**Tabla 10. Actividad enzimática de la lipasa producida por *Marinobacter* sp CH27, según diseño estadístico experimental Box- Behnken.**

N° Experimento	Factores					Act. Enzimática U (μmol/min)	Act. Especifica (U/mg proteína)
	pH	T (°C)	Tiempo (min)	NaCl (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)		
1	9	32,5	20	10	0,05	0,0435	00916
2	7	32,5	20	10	0,00	0,2135	1,0168
3	7	32,5	40	0	0,05	0,8378	3,8930
4	7	45,0	20	5	0,10	0,0000	0,0000
5	7	32,5	20	5	0,05	0,7018	1,8565
6	4	32,5	0	5	0,05	0,0000	0,0000
7	9	32,5	20	0	0,05	0,3074	0,8131
8	7	32,5	20	5	0,05	0,5984	1,5831
9	9	32,5	40	5	0,05	0,1863	0,8872
10	7	5,00	20	0	0,05	0,0000	0,0000
11	4	32,5	40	5	0,05	0,0000	0,000
12	7	45,0	20	10	0,05	0,1768	0,8419
13	7	5,00	40	5	0,05	0,0000	0,0000
14	7	45,0	20	0	0,05	0,3182	1,5154
15	7	5,00	0	5	0,05	0,0000	0,0000
16	7	5,00	20	10	0,05	0,0000	0,0000
17	4	5,00	20	5	0,05	0,0000	0,0000
18	7	32,5	40	5	1,00	0,2604	1,2402
19	9	32,5	20	5	0,00	0,1523	0,7253
20	4	32,5	20	0	0,05	0,0136	0,0648
21	7	32,5	0	0	0,05	0,1224	0,3238
22	7	5,00	20	5	0,00	0,0000	0,0000
23	7	32,5	0	10	0,05	0,0408	0,1079
24	4	45,0	20	5	0,05	0,0000	0,0000
25	7	32,5	20	5	0,05	0,3835	1,8263
26	7	32,5	20	10	0,10	0,1414	0,6735
27	4	32,5	20	5	0,10	0,0163	0,0777
28	7	32,5	20	5	0,05	0,3441	1,6385
29	9	45,0	20	5	0,05	0,6922	3,2964
30	4	32,5	20	5	0,00	0,000	0,000
31	7	45,0	40	5	0,05	0,1489	0,7091
32	7	32,5	20	5	0,05	0,3441	1,6385
33	9	32,5	0	5	0,05	0,0000	0,0000
34	4	32,5	20	10	0,05	0,0163	0,0777
35	7	32,5	20	0	0,10	0,2026	0,9650
36	7	45,0	0	5	0,05	0,0000	0,0000
37	7	32,5	40	5	0,00	0,2740	1,3050
38	7	5,0	20	5	0,10	0,0000	0,0000
39	7	45,0	20	5	0,00	0,2530	1,2046
40	7	32,5	0	5	0,10	0,0490	0,2331
41	9	5,0	20	5	0,05	0,0000	0,0000
42	7	32,5	20	0	0,00	0,7793	3,7109
43	7	32,5	40	10	0,05	0,1428	0,6800
44	9	32,5	20	5	1,00	0,1428	0,6800
45	7	32,5	20	5	0,05	0,3876	1,8457
46	7	32,5	0	5	0,00	0,0544	0,2590

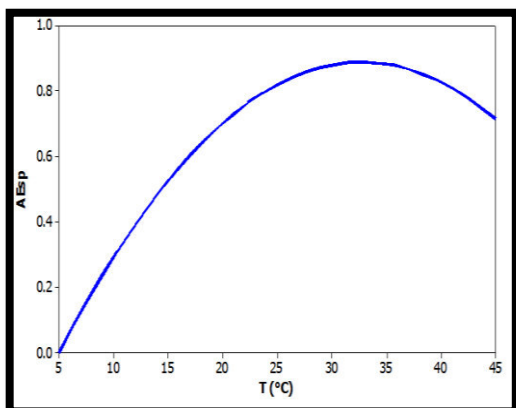
Los efectos individuales de los factores analizados frente a sus respectivas respuestas en actividad específica se presentan en la figura 12. Para este análisis se mantuvieron los parámetros medios como óptimos y se varió únicamente el parámetro a analizar en cada caso.

Los estudios de temperatura fueron realizados en el rango de 5 a 45 °C, en la distribución de actividades según temperatura se observa que entre 37 y 38 °C hay mayor hidrólisis del pNPP, por encima o debajo de estos valores la actividad enzimática disminuye. Por encima de los 38 °C se observa que la actividad disminuye aunque no drásticamente como se puede observar en la figura 12a.

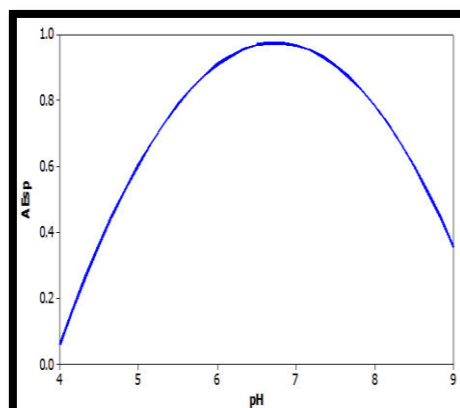
El efecto del pH en la actividad enzimática se investigó en el rango de pH 4,0 a 9,0 (figura 12.b). La actividad lipolítica a pH 4,0 es casi nula y esta se va incrementando hasta el pH 7,0 donde se obtuvo la máxima actividad, para después disminuir drásticamente a pH de 8,0 y 9,0. Los efectos de los cationes sodio y calcio en la actividad de la enzima (figuras 12c y 12d) fueron ensayados debido a que *Marinobacter sp CH27*, fue aislada de un ambiente salino y descrita como halófila moderada <sup>(41)</sup>. En las figuras se observa que la hidrólisis del p-nitrofenil palmitato es mayor en ausencia de calcio y sodio y que a medida que se aumenta la concentración de estos cationes la actividad disminuye.

El efecto del tiempo en la actividad específica se presenta en la figura 12e, donde se observa la máxima actividad a partir de los 30 min.

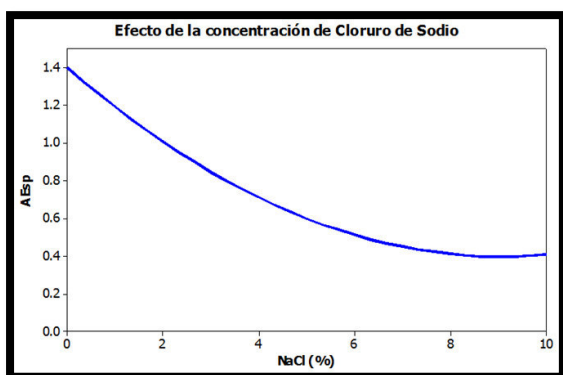
a



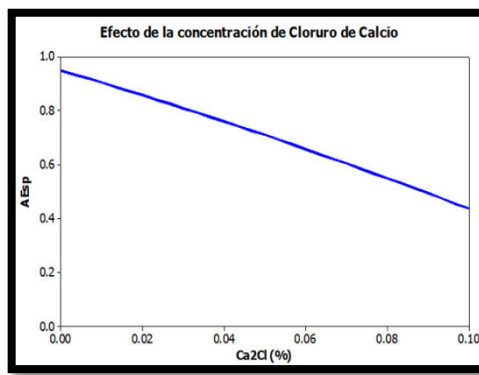
b



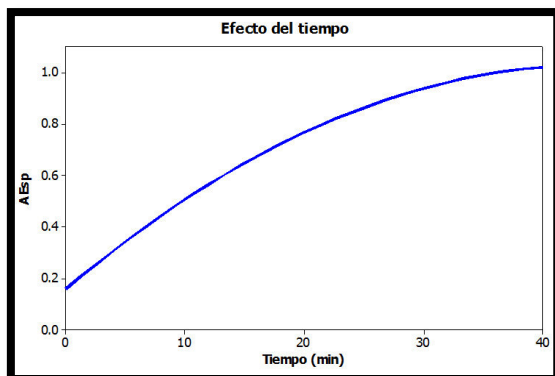
c



d



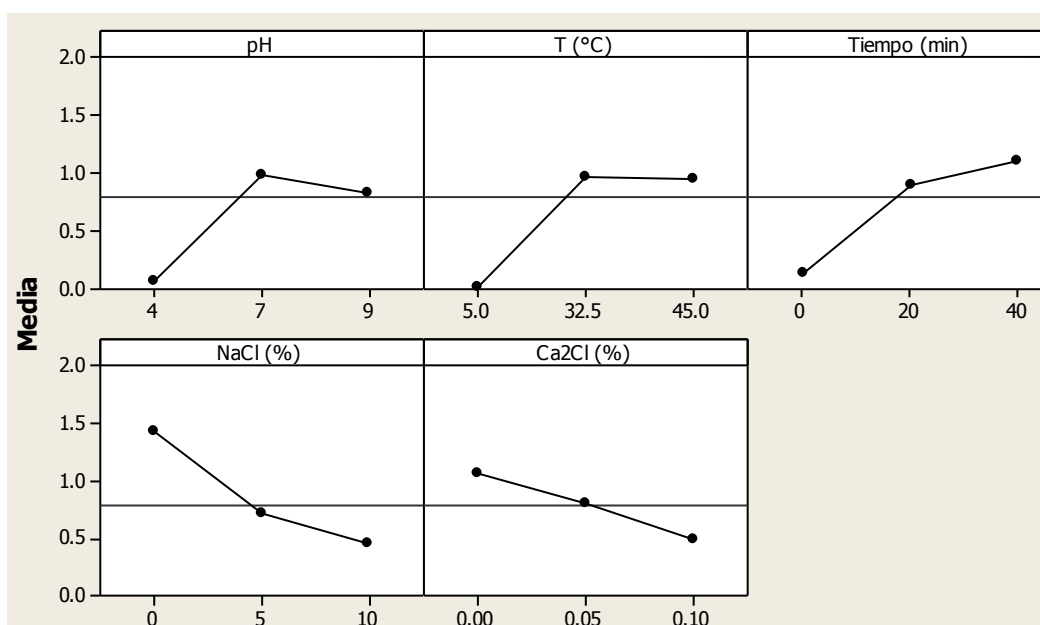
e



**Figura 12.** Actividad de la lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27, según: temperatura (a), pH (b), concentración de cloruro de sodio (c), concentración de cloruro de calcio (d) y tiempo (e).

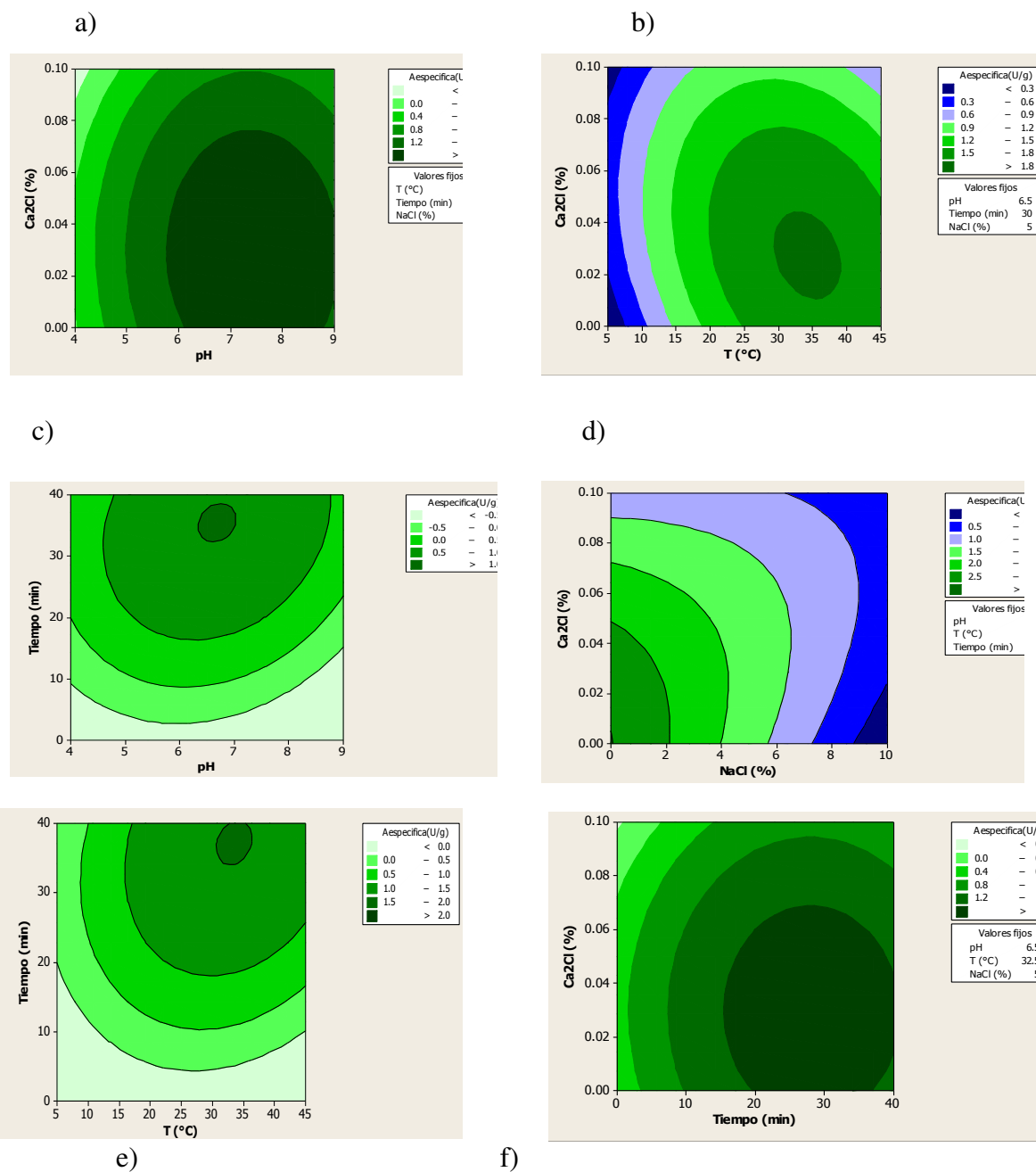


En la figura 13 se presenta el análisis de efectos principales en la actividad específica de hidrólisis de pNPP, como se puede observar los efectos de pH, temperatura, tiempo y concentración de cloruro de sodio afectan la actividad específica, pH, temperatura y tiempo afectan en la actividad específica en la misma magnitud y para el caso de la concentración de cloruro de sodio este afecta de manera negativa al igual que el cloruro de calcio.



**Figura 13. Efectos principales en la actividad enzimática de lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27.**

En la figura 14, se presentan las gráficas de contorno que permiten visualizar las superficies de respuesta para el diseño experimental planteado de la actividad específica de la lipasa de *Marinobacter sp* CH 27, frente a dos factores a la vez, manteniendo los otros fijos a valores medios constantes. La zona más oscura es la que presenta la máxima respuesta para cada caso.



**Figura 14.** Gráficas de contorno para la actividad específica de la lipasa de *Marinobacter sp CH27* y los factores: a) CaCl<sub>2</sub> y pH, b) CaCl<sub>2</sub> y temperatura, c) tiempo y pH, d) CaCl<sub>2</sub> y NaCl, e) tiempo y temperatura, f) CaCl<sub>2</sub> y tiempo.

Según el análisis de varianza, presentado en la tabla 11, el modelo de regresión es significativo ( $p= 0,004$ ), lo que indica que por lo menos uno de los términos en la ecuación de regresión tiene impacto sobre la respuesta media de la actividad específica de la lipasa.

**Tabla 11. Análisis de varianza para la actividad específica de lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27. Según superficie respuesta a 5 factores y 3 niveles**

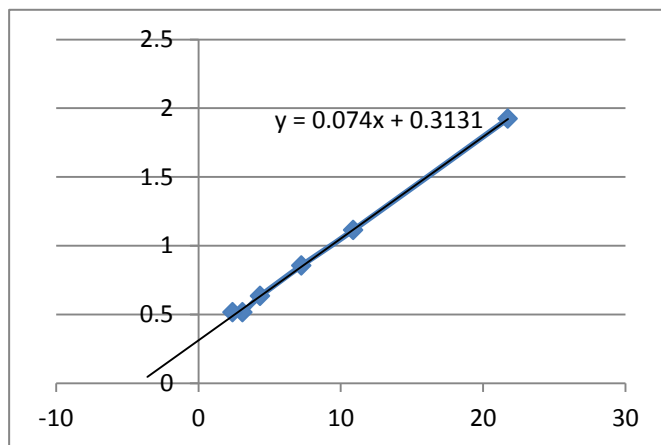
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	F	P
Regresión	20	31,450	31,4503	3,15	0,004*
Lineal	5	17,370	2,8277	1,13	0,368
pH	1	3,1844	2,6463	5,31	0,030*
T (°C)	1	5,1780	0,2575	0,53	0,479
Tiempo (min)	1	3,9099	0,4961	1,00	0,328
NaCl (%)	1	3,7801	0,2931	0,59	0,450
CaCl <sub>2</sub>	1	1,3176	0,0339	0,07	0,796
Cuadrática	5	7,3793	1,4729	2,96	0,031*
pH*pH	1	2,3761	4,6394	9,31	0,005*
T *T	1	1,4846	2,8852	5,76	0,024*
Tiempo *Tiempo	1	2,2517	3,0168	6,05	0,020*
NaCl*NaCl	1	0,0263	0,2020	0,41	0,530
CaCl <sub>2</sub> * CaCl <sub>2</sub>	1	1,2407	1,2176	2,44	0,131
Interacción	10	6,7010	6,7010	1,34	0,262
pH*T (°C)	1	1,4368	1,4368	2,88	0,451
pH*Tiempo	1	0,2821	0,2928	0,59	0,532
pH*NaCl	1	0,1918	0,2004	0,40	0,950
pH*Ca <sub>2</sub> Cl	1	0,0012	0,0020	0,00	0,425
T(°C)*Tiempo	1	0,3281	0,3281	0,66	0,439
T (°C)*NaCl	1	0,3077	0,3077	0,62	0,432
T (°C)*Ca <sub>2</sub> Cl	1	0,3175	0,3175	0,64	0,038*
Tiempo(min)*NaCl	1	2,3923	2,3923	4,80	0,978
Tiempo *Ca <sub>2</sub> Cl	1	0,0004	0,0004	0,00	0,101
NaCl *Ca <sub>2</sub> Cl	1	1,4432	1,4432	2,90	
Error residual	25	12,4606	12,460		

(\*) Estadísticamente significativo

Se identifica como significativo al término cuadrático  $P = 0,031$ , con 3 efectos cuadráticos individuales  $\text{pH} * \text{pH} = 0,005$ ,  $T (^{\circ}\text{C}) * T (^{\circ}\text{C}) = 0,024$ ,  $\text{tiempo} * \text{tiempo} = 0,02$ . Lo que indica que las relaciones entre pH y actividad específica, tiempo y actividad específica y temperatura y actividad específica siguen el modelo polinomial de segundo orden. En cuanto a los efectos lineales el modelo contiene un efecto lineal significativo que es el pH ( $P = 0,030$ ), es decir la actividad específica difiere con el pH. En términos generales la interacción no es significativa ( $P = 0,262$ ), sin embargo el modelo contiene una sola interacción de dos factores para tiempo (min) \* NaCl (%) con un valor de P menor que 0,05, lo cual constituye un efecto de interacción significativa. Es decir, el efecto del tiempo en la actividad específica de la lipasa se ve afectado con la variación de la concentración de cloruro de sodio.

#### **4.1.2.- Parámetros cinéticos de la lipasa de *Marinobacter sp.***

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) fueron determinados de la gráfica de Lineweaver Burk (Figura 15). Se encontró un valor de  $K_m$  de 0.2428 mM y  $V_{\text{máx}}$  de 3.19 U/mg.



**Figura15.** Gráfico de dobles recíprocos (Lineweaver Burk), empleando diferentes concentraciones de pNPP,buffer fosfato pH 7.0 y temperatura de 37°C .

#### 4.2.- Inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27 en soporte octadecilo sepabead

La inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27 fue obtenida a diferentes pH, tiempos y diferentes valores de fuerza iónica, los resultados de proteína inmovilizada y actividad enzimática durante el proceso de inmovilización, se presentan en las tablas 12 y 13 respectivamente. En la tabla 12 se observa que los experimentos 13 y 14 (pH 7,0; 60 min y fuerza iónica 5 mM) son los que presentan el mayor porcentaje de proteína inmovilizada (97,6 %), en tanto que en el experimento N°8 ( pH 8,0; 60 min y fuerza iónica 10 mM), es el que presenta el menor porcentaje (50,27 %). En la tabla 13, se presenta los resultados para la actividad de la lipasa durante la inmovilización. El experimento N° 3 (pH 7,0; 30 min, fuerza iónica 2.5 mM) fue el que presento la máxima actividad enzimática (10,66 U/g-soporte) y el experimento N° 8 (PH 8,0; 60 min y fuerza iónica 10 mM), es el que presenta la más baja actividad enzimática de 1,071 U/g-soporte.

**Tabla 12.** Proteína cargada al soporte octadecilo –sepabead, durante el proceso de inmovilización de lipasa de *Marinobacter sp* CH27 .

Experimento (N°)	pH	Tiempo (min)	Fza. Iónica (mM)	Proteína Inmovilizada (mg/g)	Proteína inmovilizada (%)
1	8	60	2,5	8,25	55,00
2	6	30	5,0	14,30	95,33
3	7	30	2,5	14,39	95,93
4	8	30	5,0	10,13	67,50
5	6	60	10,0	14,44	96,26
6	6	120	5,0	14,61	97,40
7	7	120	2,5	14,56	97,07
8	8	60	10,0	7,54	50,27
9	6	60	2,5	14,59	97,27
10	7	30	10,0	14,38	95,87
11	8	120	5,0	11,29	75,27
12	7	120	10,0	14,63	97,50
13	7	60	5,0	14,64	97,60
14	7	60	5,0	14,64	97,60
15	7	60	5,0	14,42	96,13

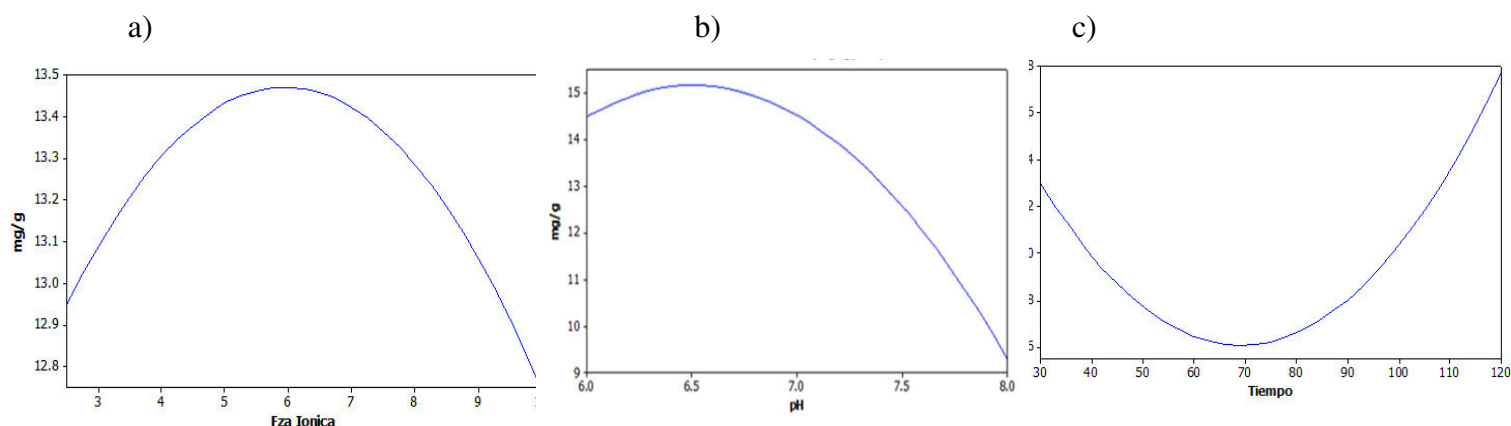
**Tabla 13. Variación de la actividad específica durante el proceso de inmovilización de lipasa de *Marinobacter sp* CH27 en octadecilo –sepabead.**

Experimento N°	pH	Tiempo (min)	Fza iónica	Act.Enzimática μmol/min	Act. Enzimática/g U/g soporte
1	8	60	2,5	0,03800	1,4250
2	6	30	5,0	0,08280	5,5096
3	7	30	2,5	0,17680	10,6601
4	8	30	5,0	0,10900	4,0875
5	6	60	10,0	0,11900	6,8723
6	6	120	5,0	0,09920	4,9117
7	7	120	2,5	0,13800	7,1122
8	8	60	10,0	0,02856	1,0710
9	6	60	2,5	0,04216	2,1207
10	7	30	10,0	0,16400	10,0083
11	8	120	5,0	0,05850	2,1938
12	7	120	10,0	0,06900	3,3638
13	7	60	5,0	0,13700	6,5777
14	7	60	5,0	0,13500	6,5211
15	7	60	5,0	0,12300	5,7581

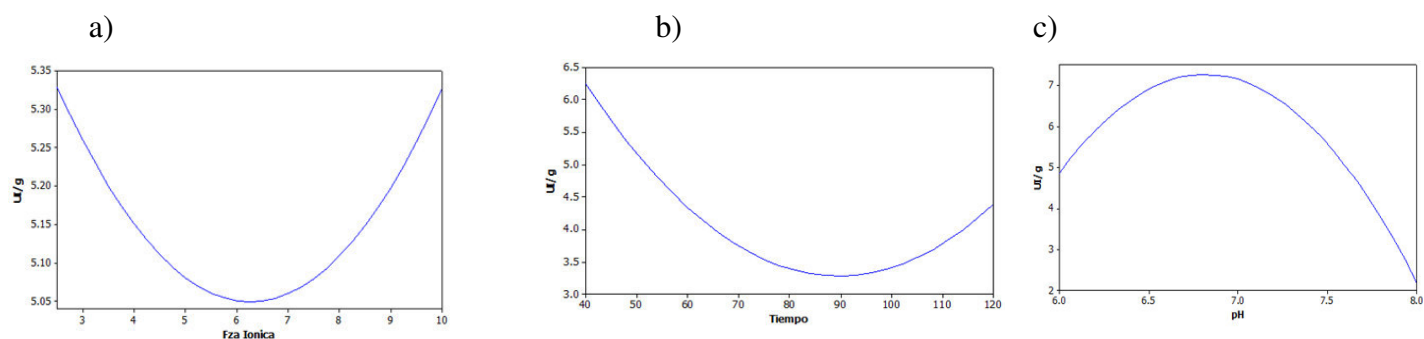
En las figuras 16 y 17 se observan los efectos individuales de los factores: tiempo, pH y fuerza iónica, sobre la inmovilización de la lipasa en el soporte octadecilo sepabead.

La inmovilización se inició a partir del extracto crudo que contenía 15 mg proteínas totales por g de soporte. En la figura 16a se observa el efecto de la fuerza iónica sobre la adsorción de las proteínas al soporte, la máxima adsorción se obtuvo a la concentración de 6 mM, por encima de esta concentración, la adsorción de la proteína al soporte disminuye. El efecto

inverso se observa en la actividad de la enzima inmovilizada, la máxima actividad se presentó a baja fuerza iónica (2,5 mM), (figura 17a).



**Figura 16.** Factores que influyen sobre la adsorción de la proteína al soporte octadecilo sepabeado durante el proceso de inmovilización de la lipasa. (a) fuerza iónica, (b) pH y (c) tiempo.



**Figura 17.** Factores que influyen en la actividad específica de la enzima inmovilizada en octadecilo sepabeado durante el proceso de inmovilización. a), fuerza iónica, b) tiempo y c) pH

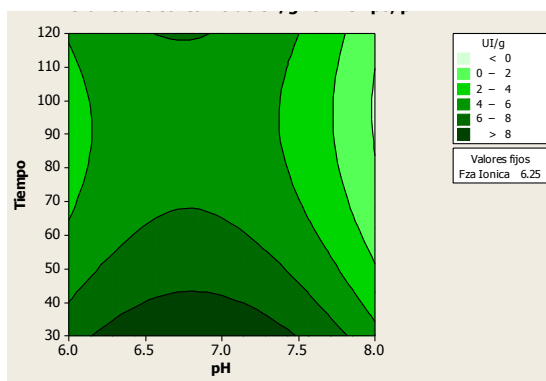
En la figura 16b, se observa el comportamiento de la inmovilización y el tiempo mediante el gráfico de la campana invertida, a los 30 min se observó la máxima proteína adsorbida al soporte y la máxima actividad específica, cabe destacar que para la inmovilización se



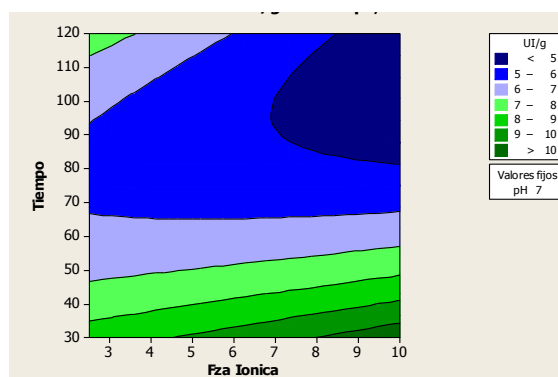
utilizó las proteínas totales del sobrenadante por lo que podría existir más de una lipasa esto se evidenció al incrementar la inmovilización de la proteína a los 70 min.

El pH influye de la misma manera tanto en la inmovilización de la proteína como en la actividad de la enzima inmovilizada, en ambos casos se presenta una campana de Gauss denotando el pH 6,5 como óptimo para la adsorción de la proteína y pH 7,0 para la actividad hidrolítica (figuras 16b y 17 b)

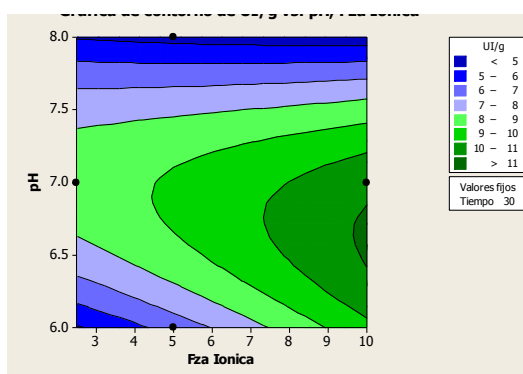
A partir de las gráficas de contorno se evaluó la actividad enzimática (U/g soporte), cuando la enzima se inmovilizo y vario el pH, tiempo y fuerza iónica (figura 17); La máxima actividad (> 8 U/g soporte), se obtuvo a 30 min y pH 6,5 manteniendo constante la fuerza iónica en 6,25 mM (figura 18a). Para el caso de la relación entre la actividad enzimática ante variaciones de tiempo y fuerza iónica simultáneamente se observó que no se generó líneas de contorno (figura 18 b). La figura 18c muestra cómo la actividad enzimática se relaciona con el pH y la fuerza iónica cuando el tiempo se mantiene constante a 30 min, la mayor respuesta (> 11 U/g soporte) se da cuando el pH está ligeramente sobre 6,5 y la fuerza iónica por encima de 10 mM.



a)



b)



c)

**Figura 18.** Gráficas de contorno de dos factores, de la actividad específica de la lipasa durante el proceso de inmovilización frente a: a) Tiempo y pH, b) tiempo y fuerza iónica, c) pH y fuerza iónica.

El análisis de varianza (tabla 14) demuestra que no existe interacción significativa entre los factores estudiados y la respuesta dada en actividad enzimática ( $P > 0,05$ ). El modelo de la ecuación es de tipo cuadrático ( $P = 0,020$ ) con un solo elemento cuadrático significativo para la relación  $\text{pH} * \text{pH}$  ( $P = 0,007$ ).

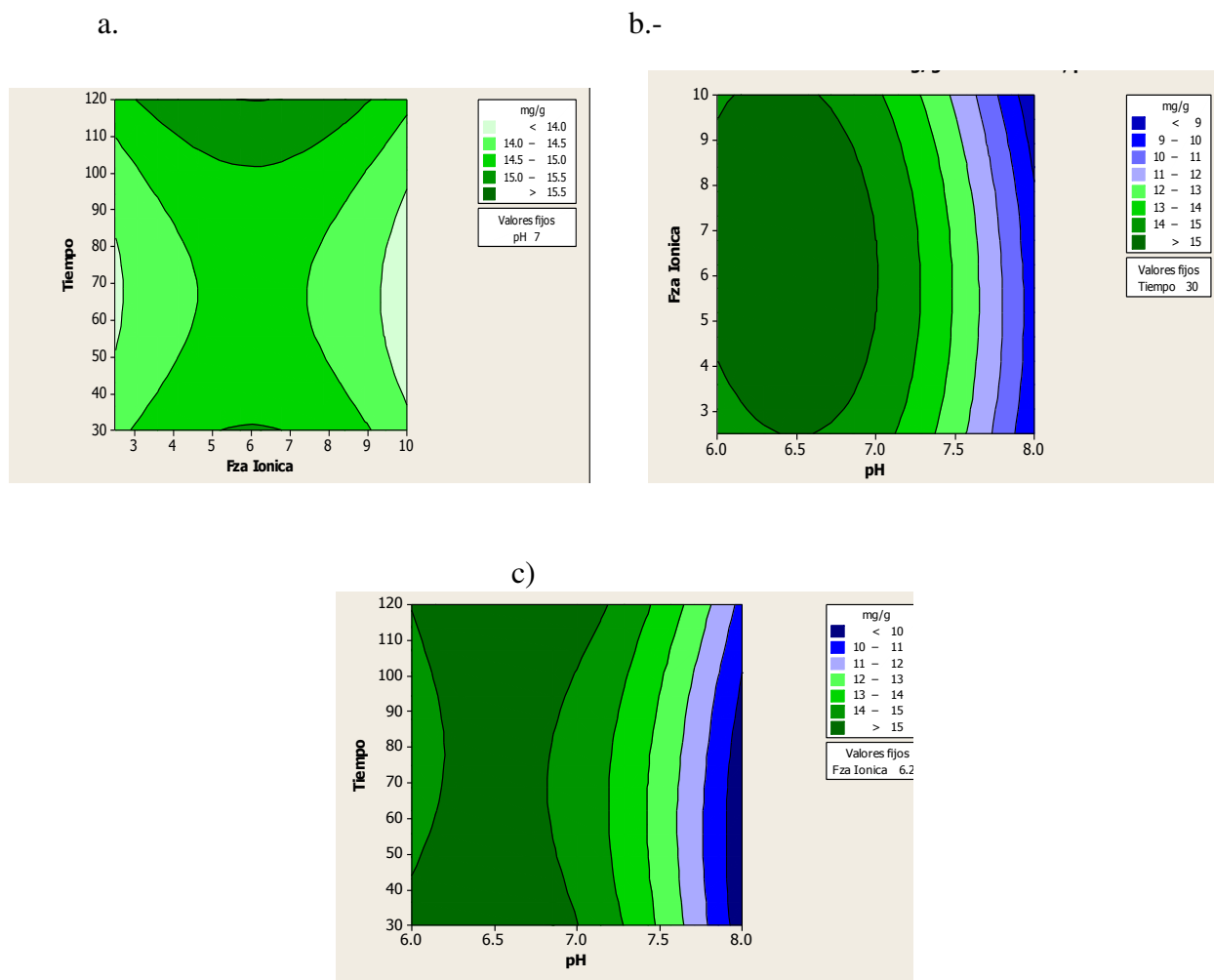
**Tabla 14. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada en octadecilo sepabead.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Sec.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regresión	9	105.558	11.7287	4.75	0.050**
Lineal	3	27.599	14.4299	5.84	0.043
pH	1	14.147	18.3562	7.43	0.042**
Tiempo (min)	1	13.444	24.7956	10.03	0.025**
Fza. iónica	1	0.008	0.3698	0.15	0.715
Cuadrática	3	62.790	21.5548	8.72	0.020**
pH*pH	1	49.740	47.3594	19.16	0.007**
Tiempo *Tiempo	1	13.017	13.0431	5.28	0.070
Fza iónica*Fza I	1	0.033	0.0329	0.01	0.091
Interacción	3	15.170	5.0565	2.05	0.226
pH* Tiempo	1	0.195	0.3401	0.14	0.726
pH* Fza iónica	1	7.305	7.3051	2.96	0.146
Tiempo*Fza iónica	1	7.670	7.6696	3.10	0.138
Error residual	5	12.358	2.471		

\*\* Estadísticamente significativo

El modelo contiene dos efectos lineales pH y tiempo,  $P = 0,042$  y  $0,007$  lo que significa que la actividad enzimática durante la inmovilización varía dependiendo del tiempo y el pH.

En la figura 19a se observa cómo el tiempo y la fuerza iónica se relacionan con la concentración proteína inmovilizada cuando el pH se mantiene en 7,0; el área oscura se encuentra por encima de los 100 min y a 6 mM de fuerza iónica, indicando que corresponde a la mayor proteína inmovilizada.



**Figura 19.** Relación entre la proteína inmovilizada y los factores, según gráficas de contorno de dos factores. a) tiempo y fuerza iónica , b) pH y fuerza iónica, c) Tiempo y pH.

La relación entre fuerza iónica, pH y concentración de proteína inmovilizada cuando el tiempo se mantiene en 30 min, se observa en la figura 18 b. En este caso, la máxima respuesta se obtiene a pH 6,5; sin importar el valor de la fuerza iónica ya que la franja oscura que corresponde a la mayor respuesta se extiende en el rango de 4,0 a 10 mM, un comportamiento similar se presenta cuando se observa la relación entre tiempo, pH y

concentración de proteína inmovilizada, la mayor concentración se obtuvo a pH 6,5, no influye el tiempo, ya que la mayor respuesta se encuentra entre 30 y 120 min.

El análisis de varianza (tabla 15) demuestra que no existe interacción significativa entre los factores estudiados y la respuesta dada en proteína inmovilizada ( $P = 0,634$ ), el modelo demuestra que los términos lineal y cuadrático tienen algún efecto sobre la proteína inmovilizada ya que presentan valores de  $P < 0,05$ . El modelo contiene un efecto lineal (pH), con  $P = 0.000$  y dos efectos cuadráticos pH\*pH ( $P = 0,002$ ) y Fuerza iónica \* Fuerza iónica ( $P = 0.005$ ).

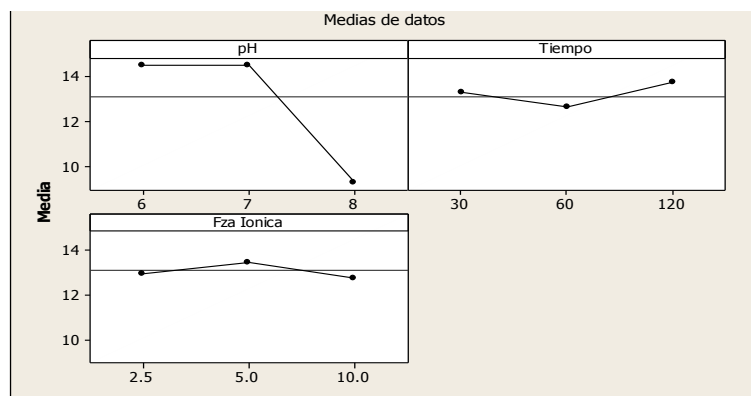
**Tabla 15. Análisis de varianza de la concentración de proteína inmovilizada en octadecilo sepabead**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	F	P
Regresión	9	85.1314	9.4590	13.88	0.005**
Lineal	3	55.0853	16.1451	23.70	0.002**
pH	1	53.7425	47.9106	70.32	0.000**
Tiempo (min)	1	1.0672	0.4321	0.63	0.462
Fza. iónica	1	0.2756	0.0743	0.11	0.755
Cuadrática	3	28.7871	9.5694	14.05	0.007**
pH*pH	1	25.7353	25.5505	37.50	0.002**
Tiempo *Tiempo	1	1.3625	1.1428	1.68	0.176
F.iónica*F. iónica	1	1.6894	1.6894	2.48	0.005**
Interacción	3	1.2590	0.4197	0.62	0.634
pH* Tiempo	1	0.7781	0.7130	1.05	0.353
pH* Fza iónica	1	0.4803	0.4803	0.70	0.439
Tiempo*F. iónica	1	0.0006	0.0006	0.00	0.978
Error residual	5	3.4066	0.6813		

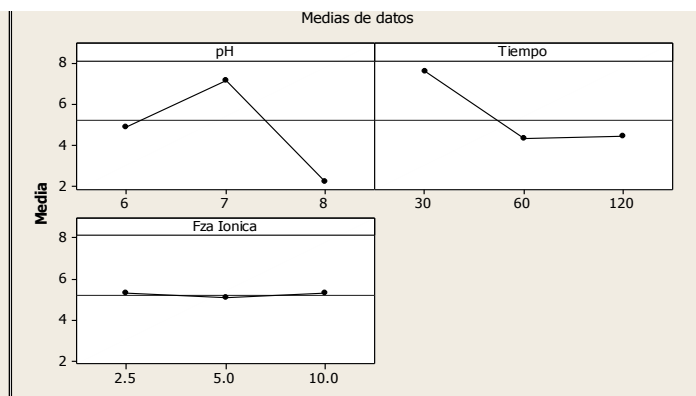
\*\*Estadísticamente significativo

Los efectos principales generados por el programa Minitab 16 (figura 20), para las respuestas proteína cargada y actividad específica de la lipasa durante la inmovilización permiten comparar los cambios en las medias de nivel para determinar cuál de los factores afectan la respuesta de manera diferente. En la figura 19a se observa que el pH es el factor principal que influye en la adsorción de la proteína al soporte durante la inmovilización, con  $P = 0,000$  (Tabla 15), en tanto que el tiempo y la fuerza iónica se mantienen casi paralelos a la media.

a)

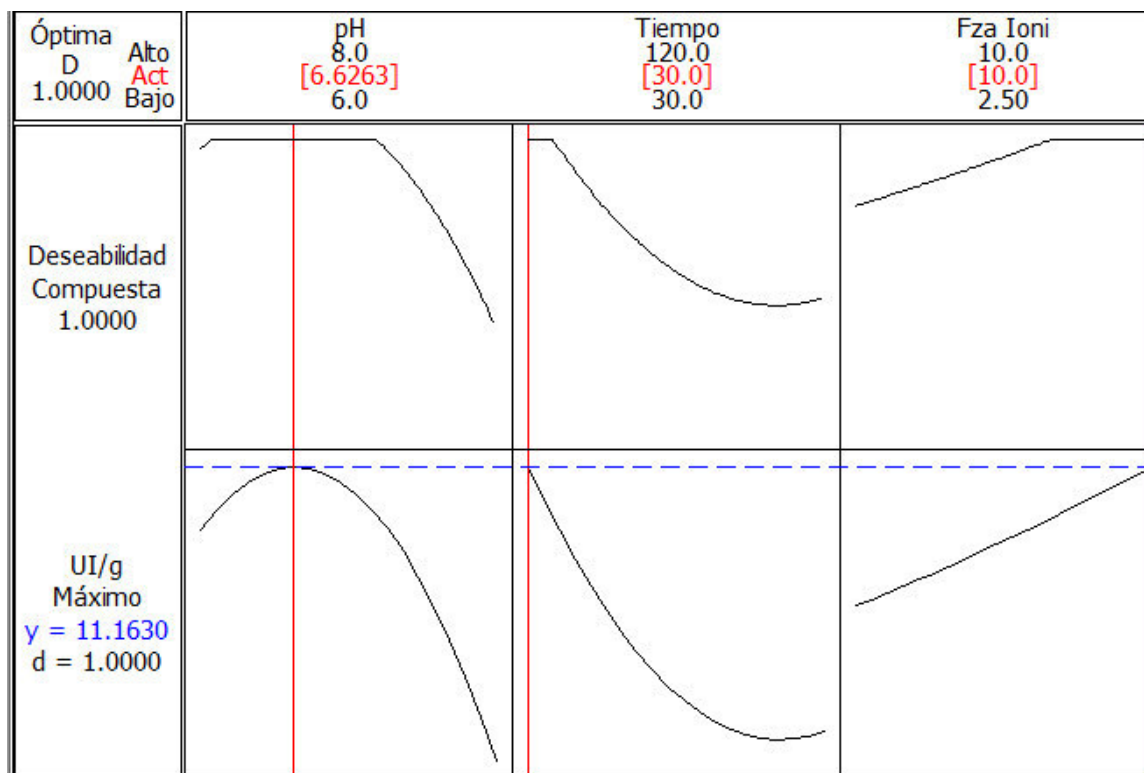


b)



**Figura 20.** Efectos principales durante la inmovilización de lipasa en soporte hidrofóbico octadecilo sepabead sobre a) proteína inmovilizada (mg/g soporte) y b) actividad enzimática (U/g soporte)

Según el modelo de simulación planteado para el diseño experimental ejecutado, el proceso de inmovilización se optimizó para alcanzar un valor de 11,1630 UI/g considerando como óptimos: pH 6,62, fuerza iónica de 10 mM y 30 min (figura 20).



**Figura 21. Optimización del proceso de inmovilización en soporte hidrofóbico Octadecilo sepabead de la lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27**

A partir de los coeficientes generados (tabla 16) se obtienen el siguiente modelo de simulación para la inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27 en soporte octadecilo sepabead:

$$Y = 51.2763X_1 - 0.1078171X_2 + 2.88701X_3 - 3.58600 X_1^2 + 0.00107060 X_2^2 + 0.00774500 X_3^2 - 0.00631556X_1X_2 - 0.3521247X_1X_3 - 0.00778456 X_2 X_3 \quad (3)$$

Donde:

Y = actividad específica en U/g soporte

X<sub>1</sub> = pH

X<sub>2</sub> = tiempo

X<sub>3</sub> = fuerza iónica

**Tabla 16.** Coeficientes de regresión estimados para la respuesta de actividad específica

Término	Coeficiente
Constante	-171.66300000
pH	51.27630000
Tiempo	-0.10781700
Fza Iónica	2.88701000
pH*pH	-3.58600000
Tiempo*Tiempo	0.00107060
Fza Iónica * Fza Iónica	0.00774500
pH*Tiempo	-0.00631556
pH * Fza iónica	-0.35124700
Tiempo * Fza iónica	-0.00778456

### 4.3.- Actividad de la lipasa inmovilizada a diferentes pH y temperatura

La lipasa de *Marinobacter sp* CH 27 contenida en el crudo enzimático fue inmovilizada, bajo las condiciones óptimas a pH 7,30 min y fuerza iónica 10 mM. A partir de las actividades específicas se calculó el rendimiento de inmovilización, que fue de 74 % (tabla 17 y Anexo 16), empleando para ello la ecuación 5 antes descrita.



**Tabla 17. Actividad residual de la lipasa inmovilizada en octadecilo-sepabead**

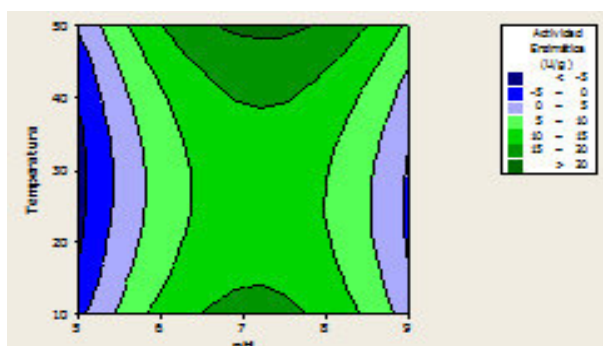
	<b>Actividad enzimática (<math>\mu\text{mol}/\text{min}</math>)</b>	<b>Actividad específica U/ mg</b>	<b>Actividad Residual ( % )</b>
<b>Lipasa libre (crudo enzimático)</b>	0,4454	0,5964	100
<b>lipasa inmovilizada</b>	0,3630	0,4418	81.50

Las diez corridas experimentales en términos de variables independientes y sus respectivas respuestas en actividad enzimática (U/g-soporte) de la lipasa inmovilizada en el soporte octadecilo- sepabead se presentan en la tabla 18. La menor actividad de hidrólisis de pNPP se presentó tanto para los experimentos: 1 pH 5,0 y 10 °C; 3, pH 5,0 y 50 °C. La mayor actividad de la enzima inmovilizada se encontró en el experimento 4, pH 7,0 y 40 °C.

**Tabla 18.** Efecto de la temperatura y el pH en la Actividad enzimática de la lipasa inmovilizada según el Diseño compuesto central a 2 factores y 3 niveles

Experimento	pH	Temperatura	Actividad enzimática ((U/g soporte)
1	5	10	0.2187
2	9	50	7.3242
3	5	50	0.1525
4	7	40	18.4632
5	7	20	7.8800
6	9	10	2.7770
7	7	30	14.8468
8	7	30	14.5260
9	8	30	11.2356
10	6	30	3.9160

La grafica de contorno generada para la respuesta en actividad (U/g soporte) de la enzima inmovilizada cuando se varían los niveles de pH y temperatura simultáneamente muestran que la máxima respuesta se obtiene a pH ligeramente mayor a 7,0 y a 50 °C (figura 22).



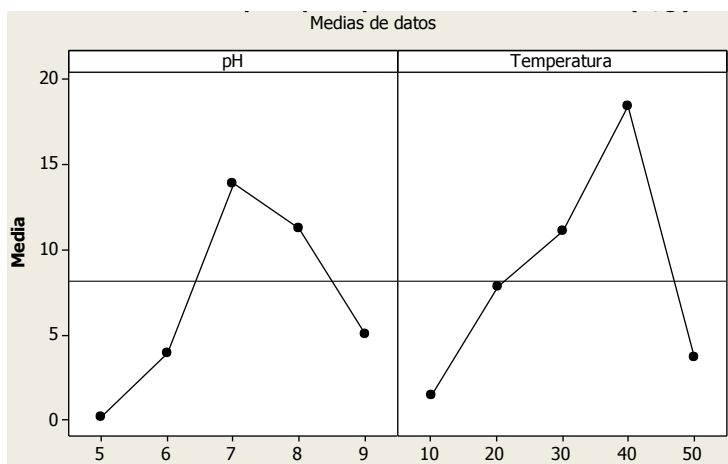
**Figura 22.** Relación entre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada de *Marinobacter sp* CH 27 y el pH y temperatura. Según gráfico de contorno.

El análisis de varianza presentado en la tabla 19, demuestra que no existe interacción entre los dos factores analizados ( $P = 0,592$ ) y el modelo polinomial de segundo orden es estadísticamente significativo ( $P = 0,041$ ).

**Tabla 19. Análisis de varianza de la actividad específica de la lipasa inmovilizada en octadecilo sepabead frente a diferentes pH y temperatura**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	F	P
Regresión	5	312,982	312,982	3,99	0,102
Lineal	2	61,064	140,989	4,49	0,095
pH	1	39,841	65,854	4,19	0,111
Temperatura (°C)	1	21,223	9,925	0,63	0,471
Cuadrática	2	246,597	246,597	7,85	0,041*
pH*pH	1	237,712	64,692	4,12	0,112
Temp *Temp	1	8,884	8,884	0,57	0,494
Interacción	1	5,321	5,321	0,34	0,592
pH* Temperatura	1	5,321	5,321	0,34	0,592
Error residual	4	62,815	62,815		

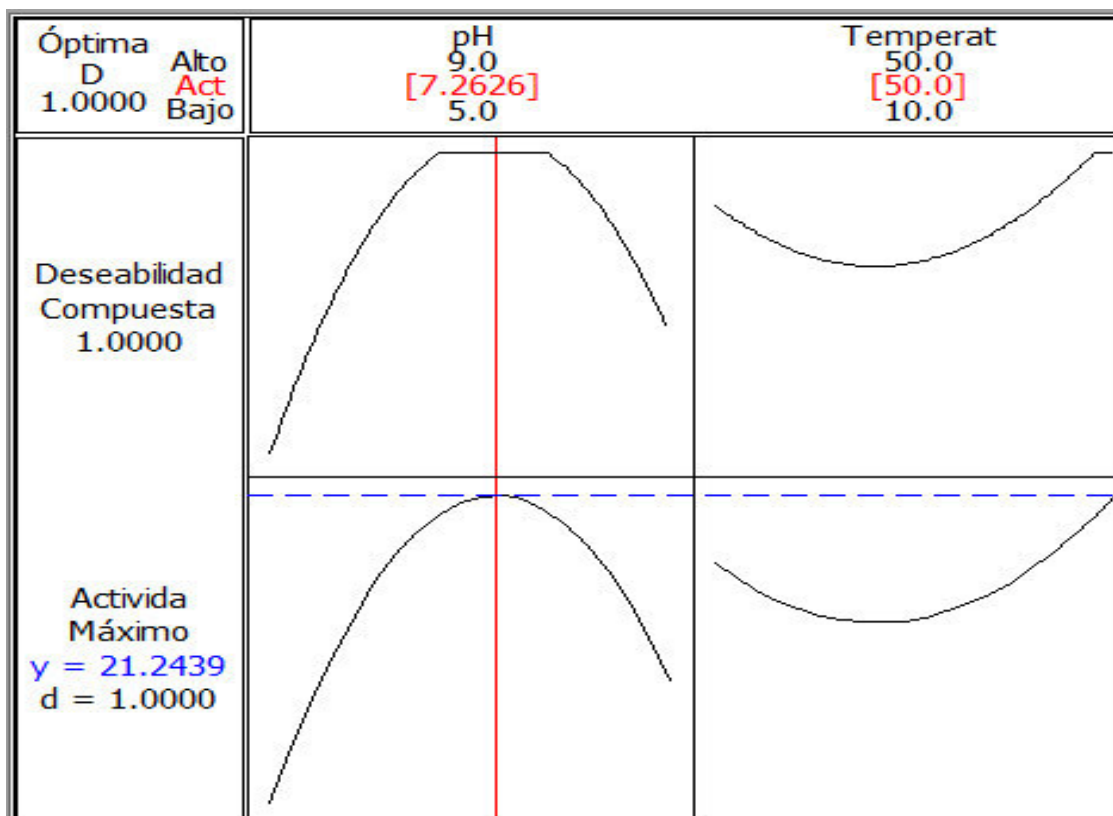
En la figura 23 se presenta los efectos principales sobre la actividad de la enzima inmovilizada, el efecto del pH y la temperatura analizados por separado influyen en la respuesta de la actividad de la lipasa inmovilizada en el soporte octadecilo sepabead, como se observa a pH 5,0 y 6,0 se obtiene las respuestas por debajo del promedio y a pH 7,0 y 8,0 la actividad se encuentra por encima del promedio, de la misma manera cuando se observa el gráfico de la temperatura se observa que la actividad específica se encuentra por debajo del promedio a 10 y 50 °C y a 30 y 40°C la actividad se encuentra por encima del promedio.



**Figura 23.** Efectos principales entre la actividad específica de la lipasa inmovilizada (U/g soporte) y el pH y temperatura

Además el análisis de varianza (Tabla 19), indica que el pH y la temperatura influyen en la actividad de la enzima inmovilizada pero no de manera significativa, con  $P > 0.05$ .

La optimización que se obtiene del diseño experimental de superficie respuesta planteado para la actividad específica de la enzima inmovilizada, se presenta a continuación en la figura 24.



**Figura 24. pH y Temperaturas óptimas de la lipasa inmovilizada en soporte hidrofóbico Octadecilo sepabead**

Según el modelo de simulación para alcanzar un valor de 21,2439 UI/g soporte se debe considerar como óptimos trabajar a pH 7,26 y a 50 °C. A partir de los coeficientes generados (Tabla 20) se plantea el siguiente modelo de simulación para la actividad específica de la lipasa inmovilizada en Octadecilo sepabead:

$$Y = 57.7818X_1 - 1.00106X_2 - 4.08279X_1^2 + 0.0151301X_2^2 + 0.0288338X_1X_2$$

Donde:

Y = actividad específica en U/g soporte

X<sub>1</sub> = pH

X<sub>2</sub> = Temperatura

**Tabla 20. Coeficientes de regresión estimados para la respuesta de Actividad específica de la lipasa inmovilizada de *Marinobacter sp* CH27**

<b>Término</b>	<b>Coeficiente</b>
Constante	-181.2970000
pH	57.7818000
Temperatura	-1.0010600
pH*pH	-4.0827900
Temperatura*Temperatura	0.0151301
pH * Temperatura	0.0288338

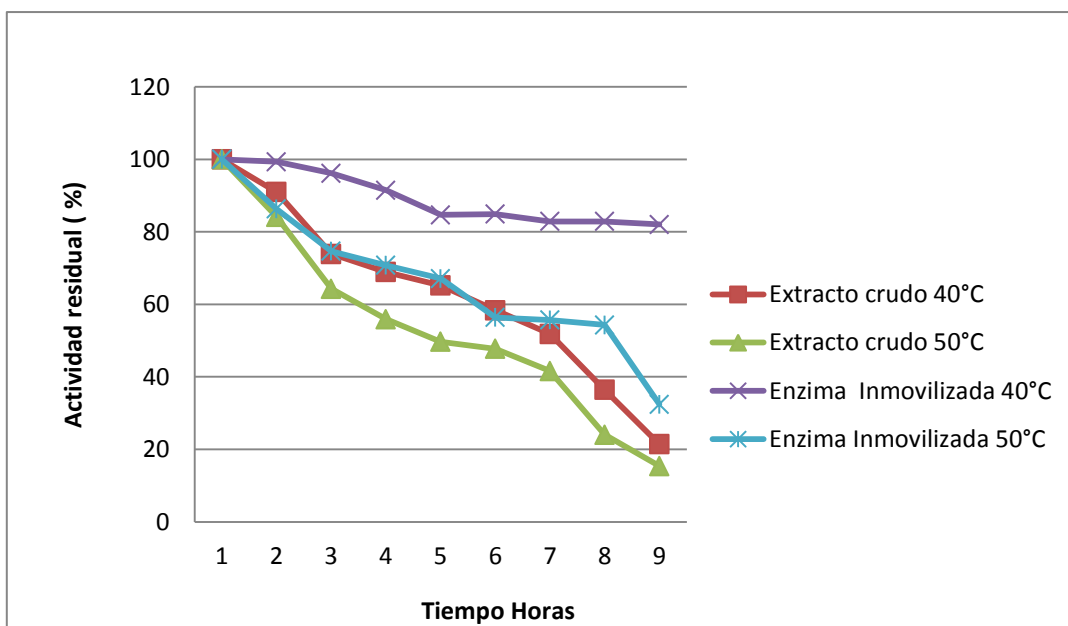
#### **4.4. Termoestabilidad de la lipasa der *Marinobacter sp* CH27 inmovilizada en octadecilo sepabead.**

La estabilidad térmica para la enzima adsorbida en octadecilo sepabead y para la enzima libre (extracto crudo), fueron ensayados a 40 y 50 °C (tabla 21). La lipasa libre pierde drásticamente su actividad a 40 y 50 °C, siendo mayor la pérdida a 50 °C, se observó que a las 8 horas se ha perdido más del 50% de su actividad inicial y a las 24 horas solo quedó el 15,4 % de actividad residual. Por otro lado, la lipasa inmovilizada pierde actividad a 50 °C, después de 10 horas mantuvo solo el 56,39 % de la actividad residual y a las 24 horas se perdió el 67,8 % de la actividad inicial. En tanto que a 40 °C se observó mayor estabilidad de la enzima inmovilizada manteniendo la actividad residual en 82 % a las 24 horas.

**Tabla 21.** Termoestabilidad de la lipasa de *Marinobacter sp* CH27 libre e inmovilizada en octadecyl-sepabead

	Actividad residual (%)	Actividad residual (%)	Actividad residual (%)	Actividad residual (%)
Tiempo Horas	Lipasa libre a 40°C	Lipasa Libre a 50°C	Lipasa Inmovilizada a 40 °C	Lipasa Inmovilizada a 50 °C
0	100,00	100,00	100,00	100,00
2	90,99	84,16	99,32	86,30
4	73,91	64,28	96,17	74,66
6	68,94	55,9	91,50	70,78
8	65,21	49,68	84,68	67,12
10	58,38	47,74	84,89	56,39
12	51,87	41,61	82,88	55,71
14	36,46	24,06	82,88	54,34
24	21,43	15,41	82,02	32,42

La figura 25 presenta la termoestabilidad de la lipasa soluble e inmovilizada ensayadas en buffer fosfato 25 mM, pH 7,0 y a 40 °C y 50 °C. La actividad residual de la enzima fue determinada usando como sustrato p-nitrofenil palmitato. La lipasa de *Marinobacter sp* CH27 inmovilizada en el soporte hidrofóbico octadecilo sepabead, conserva su actividad por encima del 80% después de una incubación de 24 horas.



**Figura 25.** Termoestabilidad del extracto crudo e inmovilizado de *Marinobacter* sp CH 27.



## **5.- DISCUSION**

La metodología de superficie respuesta (RSM), es una de las técnicas más empleadas en los procesos de optimización tanto químicos como bioquímicos, permite evaluar o diferenciar varios parámetros a la vez. La principal ventaja de esta metodología reducir el número de experimentos, proveer suficiente información de los resultados y que sean estadísticamente aceptables, lo cual es ventajoso frente a los métodos clásicos de optimización, que no relacionan las interacciones entre los diferentes factores.

Esta metodología se empleó para determinar los parámetros óptimos de la lipasa libre e inmovilizada. Además permitió optimizar el proceso de inmovilización de la enzima y determinar los parámetros óptimos de actividad de la enzima inmovilizada.

### **5.1. Caracterización bioquímica de la lipasa libre**

Los resultados del Diseño Estadístico Experimental (DEE), planteado fueron analizados por el programa estadístico Minitab 16, permitió analizar el efecto de pH, temperatura, tiempo, concentración de NaCl y CaCl<sub>2</sub>, sobre la actividad específica de la

enzima de manera individual y conjunta. Así mismo, permitió determinar los óptimos de los factores principales.

La lipasa de *Marinobacter sp CH27* contenida en el extracto crudo demostró tener actividad hidrolítica sobre el p-nitrofenil palmitato en un rango amplio de temperatura que va desde 10 a 45 °C con un óptimo de 37 °C (figura 12 a). Si bien la actividad enzimática disminuye por encima de 38 °C, pero no llega a caer drásticamente por lo que se infiere que la enzima aún tiene actividad por encima de esta temperatura, según lo descrito en investigaciones realizadas en diferentes especies microbianas, <sup>(13, 14, 16)</sup>, que reportan actividad lipolítica entre 20 - 65 °C, con óptimos entre 30 a 50 °C <sup>(13)</sup>. El alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, en la secuencia aminoacídica de las lipasas serían responsables de la actividad enzimática por encima de los 40 °C, ya que proveen una estructura compacta que evita que la enzima se desnaturalice fácilmente por cambios térmicos en el ambiente externo. Asimismo contienen puentes disulfuro que proveen alta resistencia tanto a la inactivación térmica y desnaturalización química <sup>(14)</sup>. Además, Gonzáles y col <sup>(13)</sup> han descrito que el medio en el que esta la enzima influye en la temperatura óptima, así las lipasas presentes en preparados crudos, con altas concentraciones de otras proteínas contaminantes distintas de las proteasas, aparentemente son más estables y exhiben actividad enzimática a temperaturas mayores que la óptima.

Para el género *Marinobacter*, las temperaturas óptimas de crecimiento varían según la especie, la mayoría son mesófilas y crecen entre 4 a 45 °C. Martín y col <sup>(32)</sup> describen a: *Marinobacter lipolyticus* con temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. Por otro lado Alejandro-Paredes <sup>(46)</sup>, reporto 37 °C como temperatura óptima de crecimiento de *Marinobacter sp CH27*.

Para el caso de la influencia del pH, la actividad específica de la lipasa de *Marinobacter sp CH 27* se ensayó a pH entre 4,0 a 9,0 (tabla 10 y figure 12b), se observa que el crudo enzimático es catalíticamente activo en el intervalo de pH de 5,0 a 9,0 sin actividad a pH 4,0; esta versatilidad de respuesta se explica por hidrólisis de los enlaces peptídicos lábiles que se encuentran próximo a un residuo de ácido aspártico en soluciones acidas (pH < 4,0) o por formación de agregados de alto peso molecular a pH ácido que puede ocurrir entre la enzima y las proteínas hidrofóbicas <sup>(49)</sup>.

La lipasa de *Marinobacter sp CH27*, presento actividad enzimática óptima a pH 7,0 y 37 °C. Este pH está en el rango descrito para la mayoría de lipasas de origen microbiano que presentan la mayor actividad entre 7,0 y 8,0 (tabla 2). Según lo reportado por Gonzáles y col <sup>(13)</sup>, las condiciones óptimas de pH dependen, entre otros factores del sustrato y del buffer empleado, cuando la actividad enzimática se ensaya frente a diferentes sustratos específicos, como aceite de oliva, tributirina, trioleína y otros triacilglicéridos pequeños. Asimismo, la gráfica típica de campana de Gauss con un solo punto óptimo indicaría una sola actividad, ya que podría suceder que se obtenga más de un valor de pH óptimo, cuando se trabaja con extractos crudos <sup>(14)</sup>.

Investigaciones empleando crudos enzimáticos de lipasa del género *Marinobacter* no han sido reportados. Sin embargo, Martín y col,<sup>(32)</sup> describen que *Marinobacter lipolyticus* crece óptimamente a pH 7,5. Estudios posteriores de Pérez y col<sup>(33)</sup> empleando esta misma especie, aislaron y purificaron la lipasa Lip BL, que presentó actividad hidrolítica a pH entre 6,0 a 10,0 con un óptimo de 7,0.

Por otro lado, los efectos de los cationes Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la actividad de la enzima fueron investigados debido a que *Marinobacter sp CH27* es una bacteria halófila moderada <sup>(8)</sup> y por qué se ha descrito que la actividad de muchas lipasas se modifican por estos cationes

<sup>(14)</sup> (figura 12 c y 12 d). Sin embargo, la lipasa de esta bacteria presentó mayor actividad hidrolítica en ausencia de calcio y sodio, con el incremento de las concentraciones de estos cationes disminuye la actividad enzimática.

Como se mencionó antes, la presencia de sodio modifica la actividad de la lipasa, en algunos casos de manera positiva como reportaron Sánchez y col <sup>(50)</sup>, quienes demostraron que el NaCl activa la lipasa de *Candida cylindraceae*, la misma perdió un 40 % de su actividad en ausencia de este catión. Del mismo modo, Bannu <sup>(14)</sup> ensayó el efecto del NaCl entre 0,25 a 2,0 M sobre la lipasa soluble de *Candida rugosa*. Por otro lado, Pérez y Col <sup>(33)</sup>, encontraron la actividad óptima para LipBL en ausencia de NaCl.

Según lo descrito por Bannu <sup>(14)</sup>, la activación o inhibición producida por ciertos iones depende del sustrato empleado, la fuente de la enzima y las condiciones del ensayo. En este contexto, el incremento de la actividad de muchas lipasas, que emplean como sustrato el aceite de oliva, demuestran que la unión de este ión a la enzima activa la hidrólisis del aceite de oliva al producir un cambio conformacional de la enzima. De esta manera, se potencia la unión de la lipasa en la interface agua-aceite; pero cuando se emplea tributirina como sustrato no se incrementa la actividad enzimática. Para la lipasa de *Marinobacter sp* CH27 se observó que la actividad de hidrólisis del pNPP disminuye a medida que se incrementan las concentraciones del  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 12d).

Los experimentos para determinar el efecto del tiempo en la actividad de hidrólisis del p-NPP se realizaron en un intervalo de 0 a 40 min. En la figura 12 e, se observa que la actividad enzimática se inició a partir del tiempo cero y la máxima actividad se obtuvo a los 30 min.

El análisis de componentes principales en la actividad específica de hidrólisis de pNPP, demuestra que pH, temperatura y tiempo afectan la actividad específica en la misma magnitud y de manera positiva. Así mismo, la concentración de cloruro de sodio y calcio afectan la actividad específica de manera negativa (figura 13).

La significancia estadística fue controlada por el análisis de varianza (ANOVA), donde los valores de probabilidad (P) menores a 0,05 indican significancia, la cual es importante para el entendimiento de las interacciones mutuas entre los diferentes factores. De acuerdo al análisis de varianza de pH ( $P = 0.03$ ); pH \* pH ( $P = 0.005$ ), T ( $^{\circ}\text{C}$ )\* T ( $^{\circ}\text{C}$ ) ( $P = 0.024$ ), tiempo \* tiempo ( $P = 0.02$ ), son los factores más significativos sobre la actividad específica de la lipasa en el crudo enzimático. Además el valor P, para determinar si existe o no interacción entre los diferentes factores no fue significativo ( $P = 0,262$ ) en términos generales, con una sola interacción de dos factores para tiempo \* NaCl con  $P < 0,05$ , por lo que el efecto del tiempo en la actividad específica del crudo se ve afectada con la variación de la concentración de cloruro de sodio (tabla 11).

Al evaluar la respuesta de la actividad específica de la lipasa frente a los efectos del pH y la concentración de cloruro de calcio, temperatura versus concentración de cloruro de calcio y tiempo versus concentración de cloruro de calcio (figuras 14 a, b y c) se observó que la actividad máxima fue mayor a 1,6 U/g-soporte a pH entre 7,0 y 8,0; 37  $^{\circ}\text{C}$  y 30 min, en los tres casos cuando las concentraciones de cloruro de calcio son menores a 0,04 %. Además, a medida que se incrementa las concentraciones del calcio, la actividad específica disminuye. El análisis ANOVA confirma los resultados ya que las concentraciones de cloruro de calcio no influyen en la actividad enzimática cuando se varían pH, la temperatura y/o el tiempo simultáneamente (tabla 11).

En la figura 14 d se observa la respuesta de la actividad específica cuando varían las concentraciones de cloruro de calcio y sodio simultáneamente, en este caso la mayor actividad enzimática se encuentra cuando las concentraciones de NaCl y CaCl<sub>2</sub> son menores al 2,0 % y 0,04% respectivamente y disminuye la actividad a concentraciones mayores.

Cuando varían el tiempo y la temperatura a la vez, la actividad específica se incrementa, presentando su valor máximo > 2 U/g por encima de 35 °C y 30 min (figura 14 e). Comportamiento similar se observó cuando se modificó el tiempo y el pH, simultáneamente a medida que se incrementan ambos factores la actividad específica se incrementa hasta llegar a su valor máximo a pH 7,0 y 30 min (figura 14 f).

## **5.2.- Optimización de la inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27.**

Los efectos individuales del pH, tiempo y fuerza iónica fueron investigados sobre la proteína inmovilizada y la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada en U/g soporte, (tablas 12 y 13).

Las figuras 16b y 17 b muestran el efecto que ejerce el pH en la inmovilización de la lipasa en el soporte hidrofóbico octadecilo sepabead. El sistema lipasa/octadecilo sepabead se encuentra afectado por el pH, lo que se demuestra en la campana de Gauss generada tanto para la proteína inmovilizada como para la actividad de la lipasa inmovilizada. La máxima actividad de la lipasa inmovilizada se presentó a pH7,0 con 7 U/ g- soporte, esta actividad corresponde al 89 % de la enzima adsorbida al soporte (13,4 mg/g).

Usualmente, a medida que se incrementan los valores de pH, la interacción hidrofóbica entre la proteína y el soporte disminuye, y a la vez se incrementa la hidrofiliidad debido al cambio de las cargas en la proteína<sup>(51)</sup>. La pérdida de interacción hidrofóbica se evidencio por encima del pH 7,0 donde se observara que la unión de la proteína al soporte disminuye a 9 mg / g soporte (60 %) y la actividad enzimática disminuye a 2 UI/ g soporte cuando el pH es 8,0.

Bannu,<sup>(14)</sup> para la inmovilización de la lipasa comercial de *Candida rugosa*, en soporte hidrofóbico octil-sefarosa, reporto pH 7,0 como óptimo y obtuvo 85 % de rendimiento de inmovilización de la lipasa en este soporte.

Durante el proceso de inmovilización se determinó que la fuerza iónica de 6 mM unió el 87 % de las proteínas al soporte (13,4 mg/g soporte), lo cual representa el efecto de la fuerza iónica en la adsorción de las proteínas al soporte. Además, por debajo o por encima de esta concentración la adsorción fue menor (figuras 16a y 17a). Sin embargo, la variación de fuerza iónica sobre la actividad de la enzima inmovilizada no fue significativa, ya que la actividad de hidrólisis de pNPP varía en una unidad a los diferentes niveles de fuerzas iónica empleados para esta investigación. La máxima actividad se obtuvo a 2,5 y 10,0 mM, (5.35 U/g-soporte) que corresponde a bajas concentraciones de proteína inmovilizada (<13,0 mg/g soporte).

La fuerza iónica es un parámetro importante para el proceso de inmovilización por la interacción hidrofóbica, la adsorción de las proteínas se incrementa con la fuerza iónica, aunque las diferentes concentraciones de los electrolitos que proveen la fuerza iónica pueden afectar la actividad enzimática<sup>(14, 24)</sup>. Por lo tanto, este es un parámetro que requiere ser optimizado. En este caso, se observó que al incrementar la fuerza iónica por encima de 6 mM disminuyo el rendimiento de inmovilización, este fenómeno puede explicarse por la

desorción de la proteína adsorbida ocasionada por alta fuerza iónica. Además, este fenómeno depende de la enzima, el soporte, el pH y la temperatura. Fernández -La Fuente y col <sup>(26)</sup>; Bastida y col <sup>(27)</sup>; Montero <sup>(49)</sup>, reportaron disminución de la adsorción de la lipasa al incrementar la fuerza iónica, los valores máximos de inmovilización encontrados por Bastida y Col <sup>(27)</sup> fueron obtenidos entre 5 a 10 mM de buffer fosfato al inmovilizar lipasas de diferentes fuentes tales como: *Candida rugosa*, *Candida antártica* A y B, *Humicola lanuginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus nieus*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*. Banu <sup>(14)</sup>, al inmovilizar la lipasa de *Candida rugosa* en octadecilo –sefarosa, obtuvo la máxima concentración de enzima inmovilizada a 0,5 M y la máxima actividad enzimática a 1,0 M

Se observa una campana invertida para la influencia del tiempo (fig 17 c) que indica el mismo comportamiento para la proteína inmovilizada y la actividad enzimática. La adsorción de la enzima al soporte octadecilo-sepabead se produce antes de los 30 min, luego disminuyo hasta el 84 % a medida que el tiempo aumento. A los 70 min nuevamente incremento la adsorción de la proteína, por lo que podría indicar la presencia de otra lipasa.

La rápida adsorción de la enzima al soporte sugiere que la proteína cargada se localizó en la superficie externa del soporte, en lugar de ser distribuida uniformemente a través de los poros del soporte. Tiempos de inmovilización cortos han sido reportados por Montero y col, <sup>(49)</sup>; quienes inmovilizaron el 64 % de lipasa de *Candida rugosa* en soporte de polipropileno en 1 min. También, Fernández-La fuente y col <sup>(26)</sup> inmovilizaron en 10 min y a baja fuerza iónica las lipasas provenientes de *Candida rugosa*, *Candida antártica* A y B, *Mucor miehi* en octyl-sefarosa. Además, Bannu <sup>(14)</sup>, al analizar la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa*, en soporte octadecilo-sefarosa a 20 °C y a bajas concentraciones de enzima de 5 U/ml, encontró que el 91 % de la enzima se adsorbió en 4 min.

Las gráficas de efectos principales generados por el programa informático de análisis estadístico Minitab 16 para las respuestas proteína inmovilizada y actividad específica



(figuras 20a y b) de la lipasa durante la inmovilización permiten comparar los cambios en las medias de nivel para determinar cuál de los factores afectan la respuesta de manera diferente. En la figura 20a se observa que el pH es el factor principal que influye en la adsorción de la proteína al soporte durante la inmovilización, con  $P = 0,000$  (tabla 15). En tanto que el tiempo y la fuerza iónica se mantienen casi paralelos a la media, por lo que cada nivel de estos factores afecta la respuesta de la misma manera y la media de respuesta es la misma para todos los niveles de estos factores, el análisis de varianza presenta valores de  $P > 0,05$ , por lo que estos factores no son significativos para la adsorción de la proteína. Por otro lado, al analizar los efectos principales sobre la actividad enzimática (figura 20 b) se observa que la fuerza iónica en las 3 concentraciones analizadas de 2,5; 5,0 y 10,0 mM; no es un factor principal en el proceso de inmovilización, con un  $P = 0,715$ , en tanto que el pH y el tiempo son factores que afectan la actividad de la enzima durante la inmovilización, el análisis de varianza así lo demuestra con valores de  $P = 0,042$  y  $0,025$  respectivamente (tabla 14).

Las gráficas de contorno que se generaron empleando el programa informático de análisis estadístico Minitab 16, muestra la relación entre dos variables independientes a la vez y su efecto en la respuesta de proteína inmovilizada y/o actividad enzimática, durante la inmovilización en soporte hidrofóbico octadecilo sepabead (figuras 18 y 19) las variables independientes fueron: tiempo y pH. Al variar el tiempo y el pH simultáneamente, se evidencia que la máxima actividad enzimática es  $> 8$  U/g, obtenido en el rango de pH de 6,0 a 7,5 a los 30 min (figura 17a). Por encima de estos valores, la actividad enzimática disminuye durante la inmovilización. Estos dos factores son importantes para la actividad de la lipasa durante el proceso de inmovilización. Sin embargo, las mismas variables de tiempo y pH frente a la proteína inmovilizada no presentan la misma respuesta (figura 18c), si bien la mayor concentración de proteína inmovilizada se presentó en el rango de pH entre 6,0 a 7,0 el tiempo de mayor respuesta fue sostenido entre 30 a 120 min. Estos resultados se sustentan por el análisis Anova, que indica que el pH es la única variable significativa ( $P =$

0,00) en la adsorción de la enzima al soporte, además no existe interacción entre las variables pH, tiempo ( $P=0,353$ ) (tabla 15).

Las gráficas de contorno generadas al variar el pH y la fuerza iónica simultáneamente a un tiempo constante de 30 min, frente a la actividad enzimática y concentración de proteína inmovilizada se presentan en las figuras 18 b y 19 b. La actividad enzimática máxima durante la inmovilización fue  $> 11$  U/g soporte obtenido a pH mayor de 6,5, y 10 mM de fuerza iónica. En tanto que la máxima respuesta de proteína inmovilizada se obtuvo a pH 6,5 entre 4 y 10 mM. Según, el análisis de varianza no existe interacción entre las variables pH y fuerza iónica para ambos casos,  $P > 0,05$ . Además, la variación de fuerza iónica en el rango estudiado no influye en el proceso de inmovilización (tablas 14 y 15). Para el caso de la relación entre la actividad enzimática ante variaciones de tiempo y la fuerza iónica simultáneamente se puede observar que no se generaron líneas de contorno (figura 17 b). Por otro lado la máxima concentración de proteína inmovilizada frente a las mismas variables se obtiene por encima de los 100 min y a un valor de fuerza iónica de 6 mM (figura 19 a). El ANOVA para estas dos variables demuestra que no existe interacción.

La proteína cargada en los soportes depende de varios parámetros tales como el tipo de lipasa, la superficie del soporte, condiciones ambientales y protocolos de inmovilización. Nuestros resultados evidencian que no existe relación entre la proteína inmovilizada y la actividad enzimática, ya que al incrementar las concentraciones de proteína adsorbida al soporte, la actividad de la enzima disminuye, esto se explica por la interacción proteína-proteína, que inactivan el centro activo de la lipasa. Similares resultados han sido descritos por Yüce<sup>(51)</sup>, en la optimización de la inmovilización de *Thermomyces lanuginosuse* al relacionar las concentraciones de enzima, buffer y pH frente a la actividad específica de la lipasa.

El diseño estadístico experimental Box-Behnken de superficie respuesta fue empleado para optimizar los parámetros de inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27. La optimización se realizó para la actividad enzimática de la lipasa. El análisis estadístico de los coeficientes se presenta en la tabla 16. Así mismo, el ANOVA de las variables determina que el modelo generado es polinomial de segundo orden o cuadrático ( $P = 0,020$ ). El modelo expresado por la ecuación 3 representa la actividad de hidrólisis de pNPP (U/g soporte) como una función del pH ( $X_1$ ), tiempo ( $X_2$ ), fuerza iónica ( $X_3$ ).

$$Y = 51.2763X_1 - 0.1078171X_2 + 2.88701X_3 - 3.58600 X_1^2 + 0.00107060 X_2^2 + 0.00774500 X_3^2 - 0.00631556X_1X_2 - 0.3521247X_1X_3 - 0.00778456 X_2 X_3$$

Los efectos de los parámetros de inmovilización tales como pH, tiempo, fuerza iónica, fueron investigados en la actividad de la enzima inmovilizada, los valores de significancia de estos coeficientes son importantes para el entendimiento del modelo, de acuerdo al análisis de varianza (tabla 14), pH ( $X_1$ ), tiempo ( $X_2$ ) y pH x pH ( $X_1^2$ ) son los parámetros más significativos ( $P < 0,05$ ). Además la fuerza iónica, tiempo x tiempo, fuerza iónica x fuerza iónica, presentan menor efecto,  $P > 0,05$  en la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada.

Finalmente, se alcanzó la actividad máxima de 11,1630 U/g soporte durante la inmovilización de lipasa en el soporte octadecilo sepabead a pH de 6,62, 30 min y fuerza iónica de 10 mM, en buffer fosfato.

### **5.3. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la lipasa inmovilizada.**

La inmovilización por adsorción de la lipasa contenida en el extracto crudo producido por *Marinobacter sp* CH27 en la interface proporcionada por el soporte hidrofóbico Octadecilo- sepabead, fue confirmada por la hidrólisis del p-NPP, en el biocatalizador después de la inmovilización, se demostró la selectividad del proceso.

Las técnicas de adsorción, han demostrado producir biocatalizadores que presentan altas retenciones de actividades catalíticas, aunque este principio es válido solo para enzimas puras, la inmovilización de extractos heterogéneos por ejemplo mezcla de proteínas o extracto crudo, usando métodos de adsorción interfacial en soportes hidrofóbicos ha demostrado ser un protocolo selectivo de inmovilización de lipasas <sup>(26)</sup>. Además, esta técnica permite en un solo paso inmovilizar, concentrar, purificar e hiperactivar concentraciones pequeñas de lipasas presentes en extractos crudos <sup>(6, 26, 27 y 30)</sup>. Al respecto, Palomo y col, <sup>(30)</sup>, emplearon la combinación de dos soportes hidrofóbicos: octil –agarosa y octadecilo sepabead con los que lograron purificar en octil-agarosa e inmovilizar en octadecilo sepabead la lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2).

El soporte hidrofóbico Octadecilo-sepabead se parece a la interface formado por los sustratos naturales de la lipasa. La adsorción interfacial puede producir un congelamiento de la estructura de la enzima en su forma abierta y de esta manera incrementar la aparente afinidad de la enzima por el sustrato <sup>(27)</sup>, además de la hiperactivación. Los resultados obtenidos en la presente investigación, demuestran una adsorción selectiva al soporte hidrofóbico pero no se produce hiperactivación marcada como describen diversos autores <sup>(6, 27, 28)</sup>. En este estudio se usó para-nitrofenil palmitato como sustrato un ácido carboxílico de cadena larga, mientras otros investigadores emplearon sustratos de cadena corta <sup>(6,27 y 28)</sup>. La actividad relativa obtenida fue de 81,50 %, con un rendimiento de inmovilización del 74,0 % (tabla 17). Al respecto, Palomo y col <sup>(27)</sup>, emplearon la adsorción hidrofóbica para inmovilizar las lipasas de *Candida antarctica* (fracción B), *Mucor miehei* y *Candida rugosa* a soportes fuertemente hidrofóbicos entre ellos octadecilo-sepabead. La actividad enzimática de sus preparados fueron ensayados en para-nitrofenil propionato y etil-butirato, sus resultados demostraron hiperactivación con un factor de 2 a 5 veces, para el sustrato etil-butirato, lo que no se observó para el para-nitrofenil propionato, probablemente el etil

butirato al ser un compuesto más pequeño puede acceder fácilmente al centro activo, por lo tanto la hiperactivación depende de la fuente de enzima y del sustrato.

El efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada fue ensayado según el diseño compuesto central a dos factores y 3 niveles, los resultados de las diez corridas experimentales (tabla 18), y el análisis de superficie respuesta se presentan en la figura 22 y tabla 19. Se observa que la actividad enzimática en U/g-soporte de la lipasa inmovilizada en octadecilo - sepabead se incrementa a medida que incrementan la temperatura y el pH, la máxima actividad se encontró a pH de 7,0 y a 50 °C.

La temperatura óptima de la enzima inmovilizada resulto ser mayor a 50 °C y la temperatura óptima encontrada para enzima libre fue de 37°C. Por lo tanto, la adsorción de la lipasa producida por *Marinobacter sp CH27* al soporte octadecilo sepabead, permite un incremento del óptimo en 13 °C.

Los resultados de otras investigaciones <sup>(6, 26, 27 y 28)</sup>, demuestran que la adsorción interfacial incrementa la temperatura óptima de las lipasas, por incremento de la estabilidad de la misma. El efecto de la temperatura en la actividad de la lipasa inmovilizada también fue estudiado por Palomo y col <sup>(27)</sup>, para el caso de la lipasa de *C. rugosa*, la temperatura óptima del derivado inmovilizado por adsorción interfacial presento máxima actividad de hidrólisis del etil-butilato a 55 °C, en tanto que la enzima libre presento temperatura óptima a 45 °C.

Según los resultados el pH óptimo para la enzima inmovilizada y enzima libre de *Marinobacter sp CH27*, fue el mismo, por lo que la inmovilización por adsorción no mejoro este parámetro como se observa en la gráfica de efectos principales (figura 23) que

a pH alcalino y ácido la enzima inmovilizada presenta mínima actividad, esto se podría explicar por los cambios estructurales que ocurren en la enzima por variación del pH.

La actividad enzimática de la lipasa inmovilizada demostró mayor dependencia de la temperatura que del pH (concentración de protones), aunque el análisis de varianza demostró que no existe interacción entre los dos factores analizados con  $P = 0,592$ , el termino cuadrático fue significativo con  $P = 0,041$ , por lo tanto el modelo encontrado para la influencia de la temperatura y el pH en la actividad de la lipasa inmovilizada se ajusta a una ecuación de segundo orden o polinomial (tabla 19).

#### **5.4. Estabilidad térmica de la lipasa inmovilizada en octadecilo-sepabead**

La estabilidad enzimática puede definirse como el grado en el que una enzima conserva su conformación estructural o su actividad cuando está sometida a condiciones de almacenaje, manipulaciones físicas o químicas, calor, pH, etc. En el presente trabajo se evaluó la influencia de la temperatura sobre la estabilidad tanto de la lipasa soluble (extracto crudo) como de la inmovilizada.

La estabilidad térmica de la lipasa inmovilizada fue mayor a 40 °C, siendo más estable que la soluble, además se conserva la actividad de hidrólisis de pNPP en un 82,0% después de 24 horas de incubación en buffer fosfato 25 mM, pH 7,0. Los estudios de estabilidad térmica que se han realizado en enzimas inmovilizadas por adsorción interfacial han demostrado incrementar este parámetro. Así, Palomo <sup>(30)</sup>, reportaron que la lipasa de *C. rugosa* adsorbida a octadecilo sepabead mantuvo su actividad a 45 °C durante 100 horas y la enzima soluble después de 2 horas de estar expuesta a 45 °C perdió su actividad. Además los mismos autores reportaron mayor estabilidad en presencia de solventes orgánicos para las enzimas inmovilizadas por adsorción interfacial en comparación a las

inmovilizadas por multipuntos, estos resultados demuestran que la adsorción en interface hidrofóbica no solo proporciona una inmovilización selectiva, sino que también está involucrada en el aumento de la estabilidad de la enzima.

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Bastida <sup>(6)</sup>, quien determinó la estabilidad térmica para las lipasas de *P. fluorescens*, *R. miehei*, y *M. javanicus*, las cuales fueron inmovilizadas en soporte hidrofóbico de octil-agarosa. La estabilidad térmica fue realizada en buffer fosfato 25 mM, pH 7,0 y 25 °C durante 24 horas, la actividad enzimática fue seguida por hidrólisis del p-nitrofenil propionato. Las enzimas inmovilizadas conservaron más del 80 % de la actividad inicial después de 24 horas de incubación. Por otro lado, ellos investigaron la estabilidad de las lipasas solubles e inmovilizadas a pH 7,0 y 40 °C, demostrando que las enzimas solubles pierden su actividad antes de las 6 horas de incubación y las lipasas inmovilizadas conservan su actividad por encima del 80 % después de 24 horas.

## 6.- CONCLUSIONES

1. La lipasa de *Marinobacter sp*, expreso la máxima actividad específica de hidrólisis del para-nitrofenil palmitato (p-NPP) en buffer fosfato pH 7,0 a 37 °C y 30 min en ausencia de NaCl y CaCl<sub>2</sub>. La V<sub>máx</sub> y K<sub>m</sub> fueron 3.19 U/mg y 0.2428 mM respectivamente.
2. Los principales factores que afectan la actividad enzimática de la lipasa de *Marinobacter sp* son pH, temperatura y tiempo.
3. El pH y el tiempo afectan la actividad enzimática de la lipasa de *Marinobacter sp* durante la inmovilización. Así mismo el pH es el factor principal que influye en la adsorción de la proteína al soporte octadecilo sepabed.
4. No existe interacción significativa entre pH, tiempo, fuerza iónica y la enzima inmovilizada ni en la actividad enzimática, durante el proceso de inmovilización de *Marinobacter sp*.
5. El modelo de simulación planteado para la inmovilización de la lipasa de *Marinobacter sp* sigue el modelo polinomial de segundo orden y es:



$$Y = 51.2763X_1 - 0.1078171X_2 + 2.88701X_3 - 3.58600 X_1^2 + 0.00107060 X_2^2 + 0.00774500 X_3^2 - 0.00631556X_1X_2 - 0.3521247X_1X_3 - 0.00778456 X_2 X_3$$

6. Las condiciones óptimas de inmovilización de la lipasa en el soporte octadecilo sepabead son: pH 6,62, 30 min y fuerza iónica de 10 mM, con un rendimiento de inmovilización de 74 %.
7. La máxima actividad enzimática de la lipasa inmovilizada en octadecilo - sepabead se encontró a pH 7,0 y 50 °C.
8. La lipasa inmovilizada de *Marinobacter sp* mantuvo actividad de hidrólisis de pNPP en un 82,0% después de 24 horas de incubación a 40°C.

## 7.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jaeger K-E, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53:315–351
2. Jaeger K-E, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Heuvel M van, Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 15:29–63
3. Jaeger K-E, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13:390–397
4. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol UT The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 1999; 29:119–131
5. González-Bacerio, J; Rodríguez Hernández, J; Monte Martínez, A. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2010, vol. XII, núm. 1, pp. 124-140
6. Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J., Guisán, J. M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998. 58 (5): 486-93.
7. Resindion S.R.L. Mitsubishi Chemical Corporation, web site: [www.resindion.com](http://www.resindion.com)
8. Chávez Hidalgo Liz. 2010. Bacterias Halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana – San Martín. Dirigido por Zavaleta , Amparo. Tesis de pregrado. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2012
9. Ahmed, J.A. Rodríguez, S. F, Dirk van, D. P, Carrière, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1761: 9: 995–1013
10. Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem* 2003; 37:63–71
11. Messaoudi A, Belguith H, Gram I y Hamida JB. Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(48): 8243-8247
12. Svendsen A. Lipase protein engineering. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1543:233–8

13. Hasan F, Shah AA, Sundus J, Hameed A . Enzymes used in detergents: Lipases African Journal of Biotechnology Vol. 9(31), pp. 4836-4844, 2 August, 2010 disponible online at <http://www.academicjournals.org/AJB>
14. Banu Ozürk. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. Tesis de maestria. Departamento de Biotecnología, Turkia (2001)
15. Fadiloğlu, S. iKinetics of olive oil hydrolysis by free and immobilised *Candida rugosa* lipaseî, Ph.D. Thesis, University of Gaziantep, 1996
16. Wiseman, Alan. Manual de Biotecnología de las enzimas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 1985.
17. Arroyo, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars pharmaceutica, 1998; 39:2.
18. Cifuentes A, Rojas, D. Inmovilización de lipasa de *Candida rugosa* en soporte de quitosano. Tesis de Maestria, Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales. 2006.pp
19. TISCHER, Wilhelm et al. Immobilized enzymes: Crystals or carriers. Elsevier Science. August. 1999.
20. Illanes Andres, Biotecnología de enzimas. Ediciones universitarias de Valparaíso, imprenta libra. 1994. Pag.103-151
21. PEREIRA E.B, DE CASTRO H.F., DE MORAES F, ZANIN G.M., Esterification Activity and Stability of *Candida rugosa* Lipase Immobilized into Chitosan . Applied Biochemistry and Biotechnology. 2002; Vols. 98–100,
22. Sánchez Ferrer A. Recuperación purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Escuela técnica superior de ingeniería. 2000.pp
23. Jonzo M.D., Hiol A, Druet D, Comeau L. Application of Immobilized Lipase from *Candida rugosa* to Síntesis of Cholesterol Oleate. Journal of Chemistry Technical and Biotechnology. 1997; 268-2575.
24. Guisan J. M. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition Edited by: © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2006
25. Al-Duri B, Robinson E, McNerlan S, Bailie P, Hydrolysis of edible oils by lipases immobilized on hydrophobic supports: effects of internal support structure. Journal of American Oil Chemists' Society. 1995; 72,1351–1359.
26. Fernández – la fuente - R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente P, Guisan J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports chemistry and Physics of Lipids. 1998; 93, 185–197
27. Palomo, J. M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., and Guisán, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic. 2002; 19–20C, 279–286

28. Snellman, E. A., E. R. Sullivan, and R. R. Colwell. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur J Biochem* 2002; 269:5771–5779
29. Cunha A, Fernández-Lorente G, Gutarra M.L., Bevilacqua J V, Almeida R. V, Paiva L , Fernández – Lafuente R, Guisán J.M, Freire, D. Separation and Immobilization of Lipase from *Penicillium simplicissimum* by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (2009)156:563–575
30. Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernández-Lorente, G. Pernas M., Rua, M. L., Guisán J. M., and Fernández-Lafuente, R. Purification, Immobilization, and Stabilization of a Lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports. *Biotechnol. Prog.* 2004; 20,630–635
31. Gauthier et al. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov, a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1992; 568-576
32. Martin S, Márquez M, Sánchez-Porro C, Mellado E, Arahal D y Ventosa A. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53: 1383-1390
33. Pérez D, Martín S, Fernández-Lorente G, Filice M, Guisán JM, y col. A Novel Halophilic Lipase, LipBL, Showing High Efficiency in the Production of Eicosapentaenoic Acid (EPA). *PLoS ONE*. 2011; 6(8): e23325
34. Lee M-H, Lee C-H, Oh T-K, Song J, y Yoon J-H. Isolation and Characterization of a Novel Lipase from a Metagenomic Library of Tidal Flat Sediments: Evidence for a New Family of Bacterial Lipases. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(11): 7406–7409
35. Patel RN. Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003;6:902–20.
36. Zhang HY, Wang X, Ching CB, Wu JC. Experimental optimization of enzymic kinetic resolution of racemic flurbiprofen. *Biotechnol Appl Biochem* 2005; 42:67–71.
37. Muralidhar RV, Chirumamilla RR, Ramachandran VN, Marchant R, Nigam P. Racemic resolution of RS-baclofen using lipase from *Candida cylindracea*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkde Toegep Biol Wet* 2001;66:227–32.
38. Berrobi C, Manoussos G, Oreal SA. Cosmetic, Pharmaceutical preparations containing lipase, hyaluronidase and/or Thiomucase enzymes, West Germany Patent 1,947,896 (1970).
39. Matsumae H, Furui M, Shibatani T. Lipase catalysed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of Diltiazem hydrochloride. *J Ferment Bioeng* 1993;75:93–8
40. Imamura S, Takahashi M, Misaki H, Matsuura K. Method and reagent containing lipases for enzymatic determination of triglycerides, West Germany Patent 3,912,226 (1989).

41. Kynclova E, Hartig A, Schalkhammer T. Oligonucleotide labelled lipase as a new sensitive hybridization probe and its use in bio-assays and biosensors. *J Mol Recognit* 1995;8(1–2):139–45
42. Godfrey T, Reichelt J. Industrial applications. In: *Industrial enzymology—applications of enzymes in industry*. London: The Nature Press; 1983. pp. 170–465.
43. Kumar CG, Malik RK, Tiwari MP. Novel enzyme-based detergents: An Indian perspective. *Curr. Sci.* 1998, 75: 1312–1318.
44. Jaeger K-E, Eggert T, Eipper A, Reetz MT. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 55:519–530
45. Hsu AF, Jones K, Foglia TA, Marmer WN. Immobilized lipase catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnol Appl Biochem* 2002; 36:181–6.
46. Alejandro Paredes, Arturo. Producción en cultivo discontinuo y caracterización parcial de lipasas de *Marinobacter* sp aislado de las Salinas de Pilluana. Dirigido por Zavaleta, Amparo. Tesis de pregrado. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2012
47. Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY (1995) Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841). *J. Ferment. Bioeng.* 79: 433–438.
48. Berner, D. L., Hammond, E. G. 1970. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids*. 5 (6): 558–62
49. Montero S., Blanco, A., Virto M., Ladenta L.C., Agud I., Solozabal R., Lascaray J.M., Renobales M., Llama M.J., Serra J.L., Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme, *Enzyme and microbial technology*, 15, (1993), 239–247.
50. Sanchez, A., Ferrer, P., Serrano, A., Valero F., Sola C., Pernas M., Rua M.L., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., Casa R.M., Sinistera J.V., Sanchez-Montero J.M., A controlled fed-batch cultivation for the production of new crude lipases from *Candida rugosa* with improved properties in fine chemistry, *Journal of biotechnology*, 69, issues 2–3, (1999), 169–182.
51. Yasin Yücel. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2012; 1 :39–44
52. Abigor RD, Uadia PO, Foglia TA, Haas MJ, Jones KC, Okpefa E, et al. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem Soc Trans* 2000;28:979–81.
53. Beisson F, Tiss A, Rivière C, Verger R Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000; 133–153
54. Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., Bastida, A., Blanco, R. M., Soler, G., García-Junceda, E.. 1996b Modulation of activity/stability properties of lipase from *Pseudomonas*

- fluoresces by multipoint covalent immobilization on glyoxyl-supports. En: Malcata F.X.. Engineering of / with lipases. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1996 243-56.
55. Malcata, F. X. Engineering of / with lipases: scope and strategies. En Malcata, F. X. Engineering of / with lipases. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1996. 1-16.
  56. Cunha, A. G., Fernández-Lorente, G., Gutarra, M. L. E., Bevilaqua, J. V., Almeida, R. V., Paiva, L. M. C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., Freire, D. M. G. Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports. *Appl Biochem Biotechnol* 2009;156: 563-575
  57. Margesin R, Labbe D, Schinner F, Greer CW, Whyte LG. Characterization of hydrocarbon degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol* 2003; 69: 3085-3092
  58. Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl. Biochem. Biotechnol* 2004; 118: 155-170.

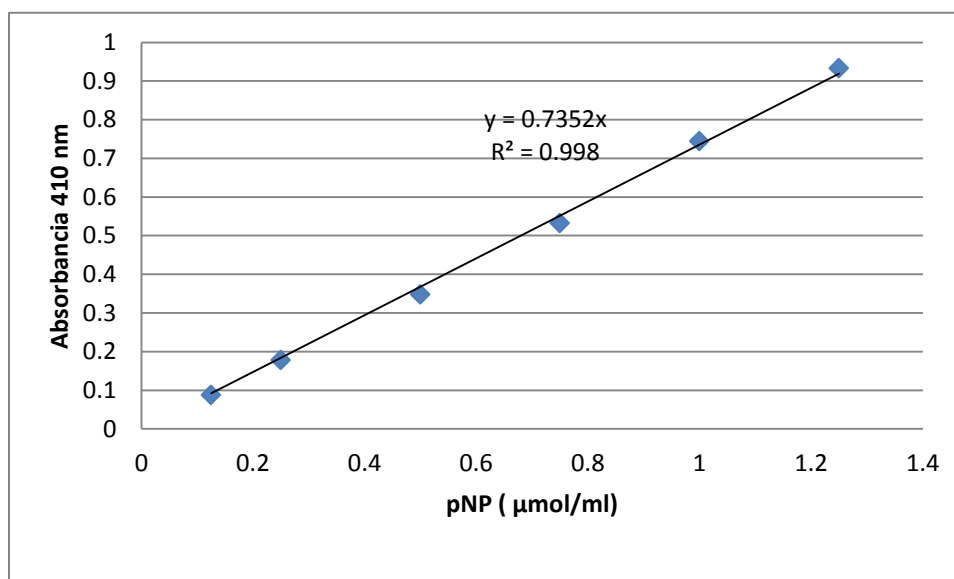
## ANEXO 1

Medio de Cultivo empleado en la producción de lipasa de *Marinobacter sp.CH27*

COMPONENTES	(g/L)	
	Agua de Mar Sintética	Agua de Sales
<b>Extracto de levadura</b>	5,00	5,00
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	3,91	5,83
<b>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	5,08	5,00
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,10	0,50
<b>KCl</b>	0,75	1,16
<b>NaCl</b>	35,00	40,00
<b>NaBr</b>	-	0,13
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	-	0,03

## ANEXO 2

### Curva de Calibración de p-nitrofenol a pH7.0 (Buffer Fosfato 25mM)



P nitrofenol $\mu\text{mol/ ml}$	Absorbancia promedio
0.125	0.088
0.25	0.178
0.5	0.348
0.75	0.532
1	0.744
1.25	0.933

El promedio de las absorbancias fueron obtenidos por triplicado de la misma solución stock de p-nitrofenol.

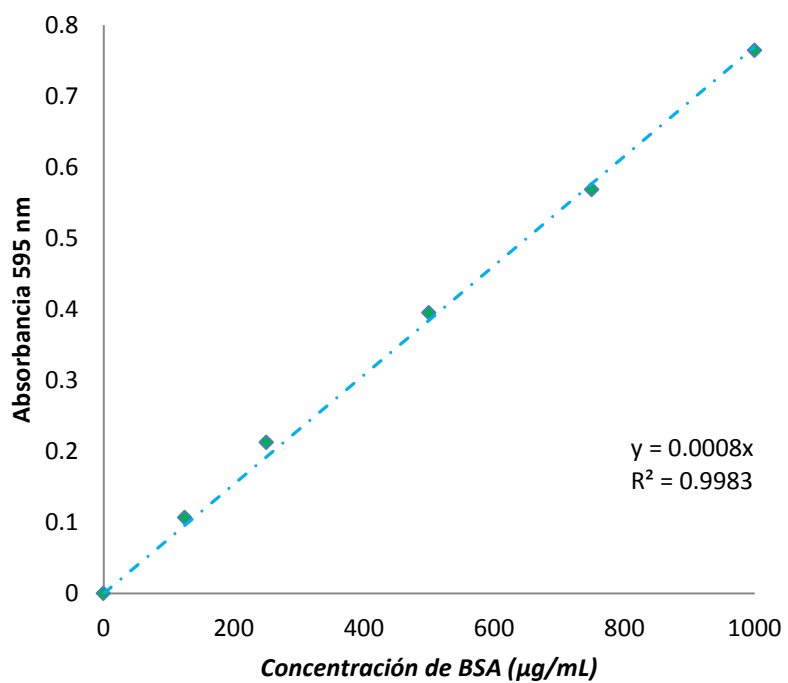
$$Y = mX$$

$$m = \epsilon = 0,7351 \text{ Abs} \times \text{ml} / \mu\text{moles} \times \text{cm}$$



### ANEXO 3

#### Curva de Calibración de proteínas por el método de Bradford



## ANEXO 4

### Diseño estadístico experimental Box- Behnken de superficie respuesta a 5 factores y 3 niveles

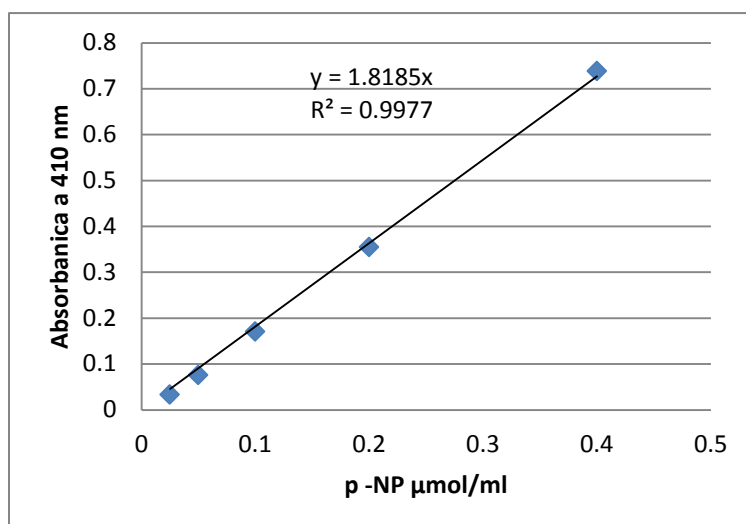
N° Experimento	Factores				
	pH	T (°C)	Tiempo (min)	NaCl (%)	Ca2Cl (%)
1	9	32.5	20	10	0.05
2	7	32.5	20	10	0
3	7	32.5	40	0	0.05
4	7	45	20	5	0.1
5	7	32.5	20	5	0.05
6	4	32.5	0	5	0.05
7	9	32.5	20	0	0.05
8	7	32.5	20	5	0.05
9	9	32.5	40	5	0.05
10	7	5	20	0	0.05
11	4	32.5	40	5	0.05
12	7	45	20	10	0.05
13	7	5	40	5	0.05
14	7	45	20	0	0.05
15	7	5	0	5	0.05
16	7	5	20	10	0.05
17	4	5	20	5	0.05
18	7	32.5	40	5	1
19	9	32.5	20	5	0
20	4	32.5	20	0	0.05
21	7	32.5	0	0	0.05
22	7	5	20	5	0
23	7	32.5	0	10	0.05
24	4	45	20	5	0.05
25	7	32.5	20	5	0.05
26	7	32.5	20	10	0.1
27	4	32.5	20	5	0.1
28	7	32.5	20	5	0.05
29	9	45	20	5	0.05
30	4	32.5	20	5	0
31	7	45	40	5	0.05
32	7	32.5	20	5	0.05
33	9	32.5	0	5	0.05
34	4	32.5	20	10	0.05
35	7	32.5	20	0	0.1
36	7	45	0	5	0.05
37	7	32.5	40	5	0
38	7	5	20	5	0.1
39	7	45	20	5	0
40	7	32.5	0	5	0.1
41	9	5	20	5	0.05
42	7	32.5	20	0	0
43	7	32.5	40	10	0.05
44	9	32.5	20	5	1
45	7	32.5	20	5	0.05
46	7	32.5	0	5	0

\*El diseño fue realizado empleando el programa estadístico Minitab 16

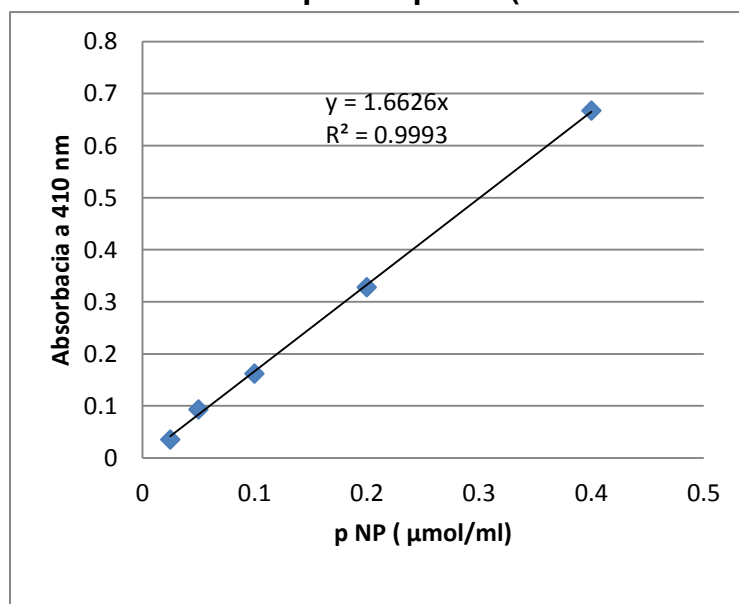
## ANEXO 5

### Curvas de Calibración de p- nitrofenol (p-NP) a diferentes pH

#### Curva de calibración de p-NP a pH10.0 (Buffer Bicarbonato 25mM)



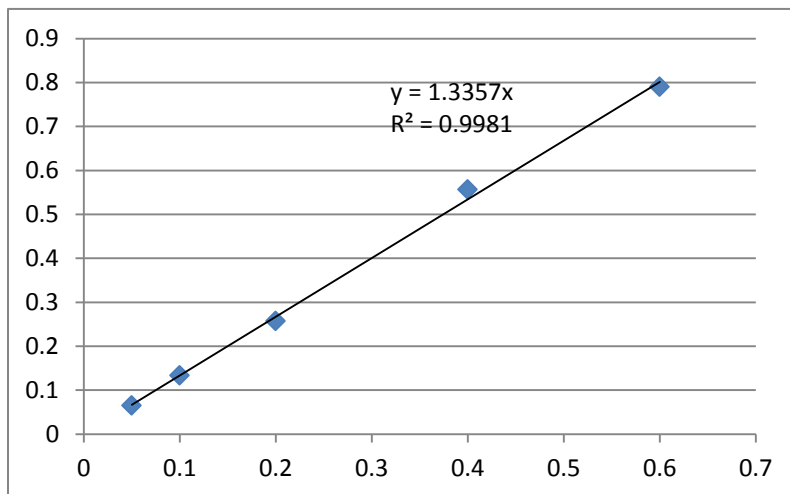
#### Curva de calibración de p-NP a pH9.0 (Buffer Bicarbonato 25mM)



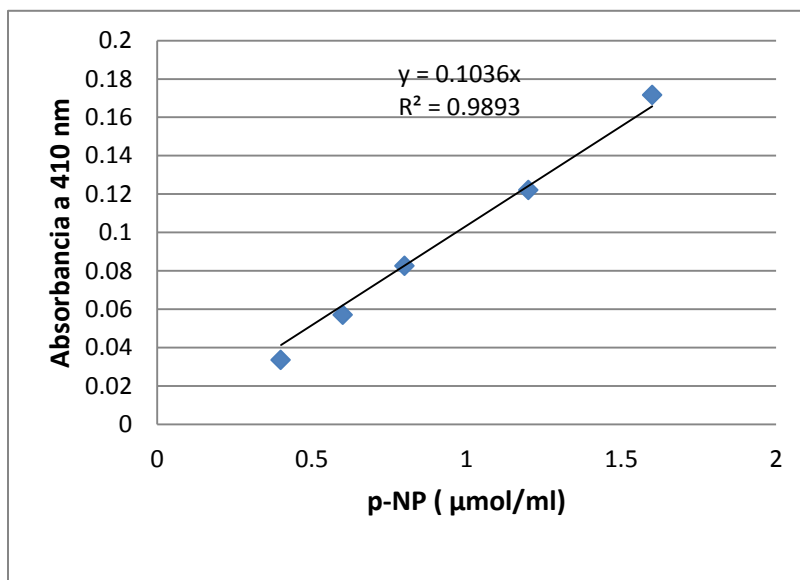
## ANEXO 5

### Curvas de Calibración de p- nitrofenol (p-NP) a diferentes pH

#### Curva de calibración de p-NP a pH8.0 (Buffer Tris 25mM)



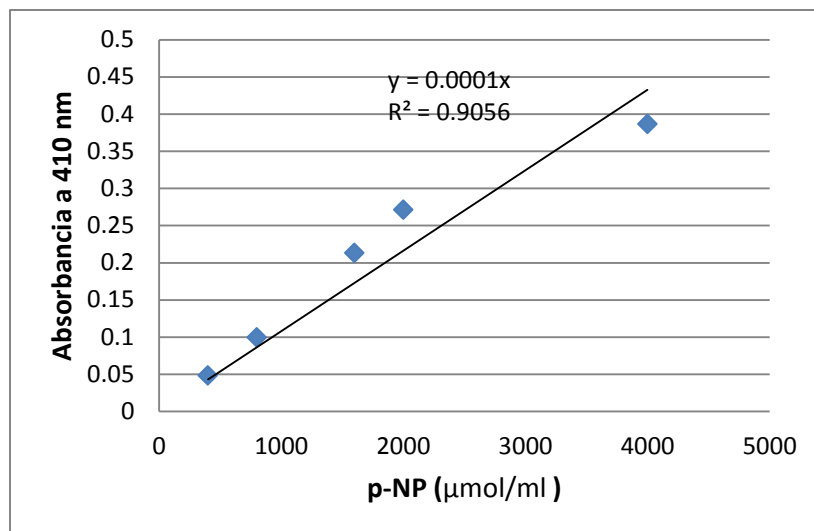
#### Curva de calibración de p-NP a pH6.0 (Buffer Fosfato 25mM)



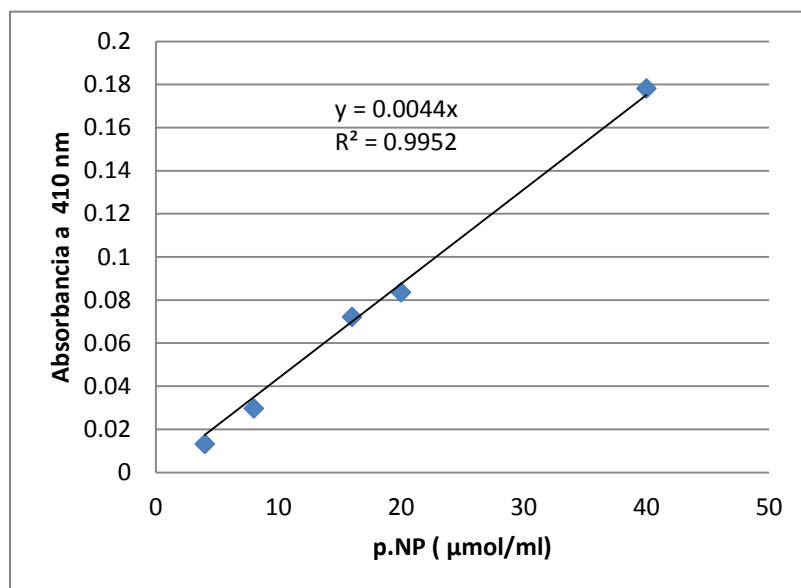
## ANEXO 5

### Curvas de Calibración de p- nitrofenol (p-NP) a diferentes pH

#### Curva de calibración de p-NP a pH5.0 (Buffer Acetato 25mM)



#### Curva de calibración de p-NP a pH4.0 (Buffer Acetato 25mM)



## ANEXO 6

**Tabla de datos experimentales obtenidos según el diseño de superficie respuesta Box-Behnken a 5 factores y 3 niveles. Empleado en la caracterización de la lipasa libre.**

pH	T (°C)	Tiempo (min)	NaCl (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Absorbancia promedio	Abs/min	Act. enzimática U/ml (μmol/ml*min)	Act. Especifica (U/mg proteína)
9	32.5	20	10	0.05	0.032	0.0016	0.01925	0.09165
7	32.5	20	10	0	0.157	0.00785	0.21195	0.56071
7	32.5	40	0	0.05	1.232	0.0308	0.83776	3.98933
7	45	20	5	0.1	0	0	0.00000	0.00000
7	32.5	20	5	0.05	0.516	0.0258	0.70176	1.85651
4	32.5	0	5	0.05	0	0	0.00000	0.00000
9	32.5	20	0	0.05	0.226	0.0113	0.13549	0.35843
7	32.5	20	5	0.05	0.44	0.022	0.59840	1.58307
9	32.5	40	5	0.05	0.274	0.00685	0.08213	0.21728
7	5	20	0	0.05	0	0	0.00000	0.00000
4	32.5	40	5	0.05	0.003	0.000075	0.00204	0.00971
7	45	20	10	0.05	0.13	0.0065	0.17680	0.84190
7	5	40	5	0.05	0	0	0.00000	0.00000
7	45	20	0	0.05	0.234	0.0117	0.31824	1.51543
7	5	0	5	0.05	0	0	0.00000	0.00000
7	5	20	10	0.05	0	0	0.00000	0.00000
4	5	20	5	0	0	0	0.00000	0.00000
7	32.5	40	5	1	0.383	0.009575	0.26044	1.24019
9	32.5	20	5	0	0.112	0.0056	0.06714	0.31973
4	32.5	20	0	0	0	0	0.00000	0.00000
7	32.5	0	0	0.05	0.0045	0.0045	0.12240	0.58286
7	5	20	5	0	0	0	0.00000	0.00000
7	32.5	0	10	0.05	0.015	0.0015	0.04080	0.19429
4	45	20	5	0.05	0	0	0.00000	0.00000
7	32.5	20	5	0.05	0.282	0.0141	0.38352	1.82629
7	32.5	20	10	0.1	0.104	0.0052	0.14144	0.67352
4	32.5	20	5	0.1	0.012	0.0006	0.01632	0.07771
7	32.5	20	5	0.05	0.253	0.01265	0.34408	1.63848
9	45	20	5	0.05	0.509	0.02545	0.30515	1.45307
4	32.5	20	5	0	0.037	0.00185	0.05032	0.23962
7	45	40	5	0.05	0.219	0.005475	0.14892	0.70914
7	32.5	20	5	0.05	0.253	0.01265	0.34408	1.63848
9	32.5	0	5	0.05	0	0	0.00000	0.00000
4	32.5	20	10	0.05	0	0	0.00000	0.00000
7	32.5	20	0	0.1	0.149	0.00745	0.20264	0.96495
7	45	0	5	0.05	0	0	0.00000	0.00000
7	32.5	40	5	0	0.403	0.010075	0.27404	1.30495
7	5	20	5	0.1	0	0	0.00000	0.00000
7	45	20	5	0	0.186	0.0093	0.25296	1.20457
7	32.5	0	5	0.1	0.018	0.0018	0.04896	0.23314
9	5	20	5	0.05	0	0	0.00000	0.00000
7	32.5	20	0	0	0.573	0.02865	0.77928	3.71086
7	32.5	40	10	0.05	0.21	0.00525	0.14280	0.68000
9	32.5	20	5	1	0.105	0.00525	0.06295	0.29975
7	32.5	20	5	0.05	0.285	0.01425	0.38760	1.84571
7	32.5	0	5	0	0.002	0.002	0.05440	0.25905

pH = 7,0 ; ε = 0,7351 Abs x ml / μmoles x cm

pH = 9,0 ε = 1,6626 Abs x ml / μmoles x cm

pH = 4,0 ε = 0,044 Abs x ml / μmoles x cm

Concentración de proteínas totales = 0,21 mg / ml

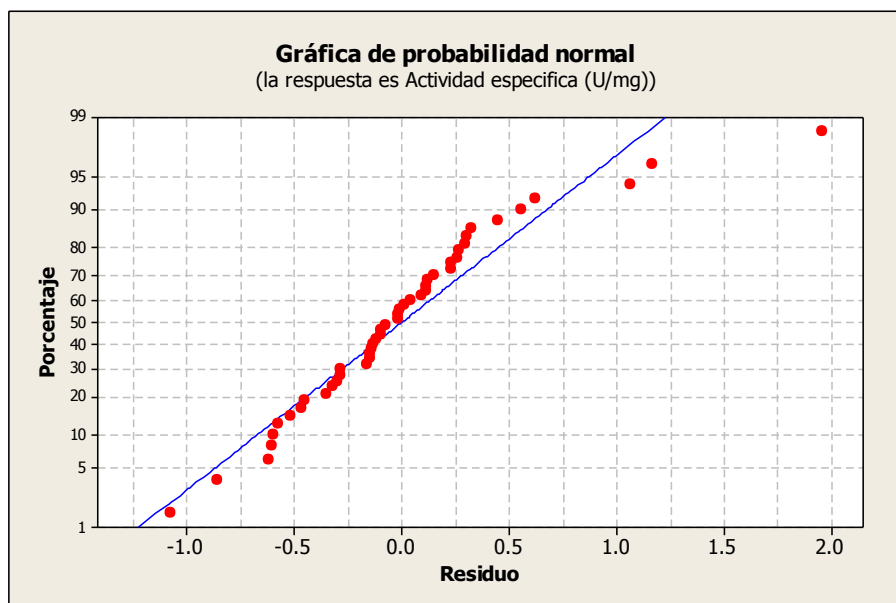
## ANEXO 7

**Análisis de varianza del análisis superficie respuesta a 5 factores y 3 niveles para la actividad específica de lipasa cruda producida por *Marinobacter sp* CH27. El procesamiento de datos realizado en el programa MINITB 16.**

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	20	31.4503		31.4503	1.57252	3.15	0.004*
Lineal	5	17.3701		2.8277	0.56553	1.13	0.368
pH	1	3.1844		2.6463	2.64625	5.31	0.030*
T (°C)	1	5.1780		0.2575	0.25746	0.52	0.479
Tiempo (min)	1	3.9099		0.4961	0.49612	1.00	0.328
NaCl (%)	1	3.7801		0.2931	0.29306	0.59	0.450
Ca2Cl (%)	1	1.3176		0.0339	0.03391	0.07	0.796
Cuadrado	5	7.3793		7.3645	1.47290	2.96	0.031*
pH*pH	1	2.3761		4.6394	4.63939	9.31	0.005*
T (°C)*T (°C)	1	1.4846		2.8852	2.88522	5.79	0.024*
Tiempo (min)*Tiempo (min)	1	2.2517		3.0169	3.01685	6.05	0.021*
NaCl (%)*NaCl (%)	1	0.0263		0.2020	0.20197	0.41	0.530
Ca2Cl (%)*Ca2Cl (%)	1	1.2407		1.2176	1.21758	2.44	0.131
interacción	10	6.7010		6.7010	0.67010	1.34	0.262
pH*T (°C)	1	1.4368		1.4368	1.43684	2.88	0.102
pH*Tiempo (min)	1	0.2821		0.2928	0.29278	0.59	0.451
pH*NaCl (%)	1	0.1918		0.2004	0.20039	0.40	0.532
pH*Ca2Cl (%)	1	0.0012		0.0020	0.00204	0.00	0.950
T (°C)*Tiempo (min)	1	0.3281		0.3281	0.32807	0.66	0.425
T (°C)*NaCl (%)	1	0.3077		0.3077	0.30767	0.62	0.439
T (°C)*Ca2Cl (%)	1	0.3175		0.3175	0.31746	0.64	0.432
Tiempo (min)*NaCl (%)	1	2.3923		2.3923	2.39228	4.80	0.038*
Tiempo (min)*Ca2Cl (%)	1	0.0004		0.0004	0.00038	0.00	0.978
NaCl (%)*Ca2Cl (%)	1	1.4432		1.4432	1.44317	2.90	0.101
Error residual	25	12.4606		12.4606	0.49842		
Falta de ajuste	20	12.3836		12.3836	0.61918	40.19	0.000
Error puro	5	0.0770		0.0770	0.01540		
Total	45	43.9109					

## ANEXO 8

**Gráfica de probabilidad normal, para los resultados experimentales obtenidos diseño de superficie respuesta Box- Behnken a 5 factores y 3 niveles, empleado en la caracterización de la lipasa libre.**



La gráfica se obtuvo empleando el programa minitab 16



## ANEXO 9

### Características técnicas de sepabead-od

#### SEPABEADS® EC-OD

---

Matriz	polymetacrilato
Apariencia	perlas esfericas de color blanco opaco
Grupo funcional	octadecyl
Diametro promedio de poro	10 - 20 nm
Densidad	> 1.1 g/ml
Retención de agua <sup>5</sup>	55 - 65%
Rango de estabilidad de temperatura	2 - 60°C
Rango de estabilidad de pH	1 - 14

## ANEXO 10

**Tabla de datos para la optimización de la inmovilización de lipasa de *Marinobacter sp*CH27 obtenidos a partir del diseño experimental Box -Behnken a 3 niveles y 3 factores**

Experimento	pH	tiempo	Fza Ionica	Prot.Residual	Prot. total	Prot. Inmb	Act.enzimática	Act.enzimática/g soporte
N		min	mM	mg/ml	mg	mg/g	μmol/minxml	U/g soporte
1	8	60	2.5	0.18	0.375	8.25	0.038	1.425
2	6	30	5	0.185	0.75	14.3063	0.0828	5.5096
3	7	30	2.5	0.16125	0.75	14.3953	0.1768	10.6601
4	8	30	5	0.13	0.375	10.125	0.109	4.0875
5	6	60	10	0.15	0.75	14.4375	0.119	6.8723
6	6	120	5	0.105	0.75	14.6063	0.0992	4.9117
7	7	120	2.5	0.1175	0.75	14.5594	0.138	7.1122
8	8	60	10	0.199	0.375	7.5375	0.02856	1.071
9	6	60	2.5	0.11	0.75	14.5875	0.04216	2.1207
10	7	30	10	0.1643	0.75	14.3839	0.164	10.0083
11	8	120	5	0.099	0.375	11.2875	0.0585	2.1938
12	7	120	10	0.1	0.75	14.625	0.069	3.3638
13	7	60	5	0.095	0.75	14.6438	0.137	6.5777
14	7	60	5	0.097	0.75	14.6363	0.135	6.5211
15	7	60	5	0.155	0.75	14.4188	0.123	5.7581

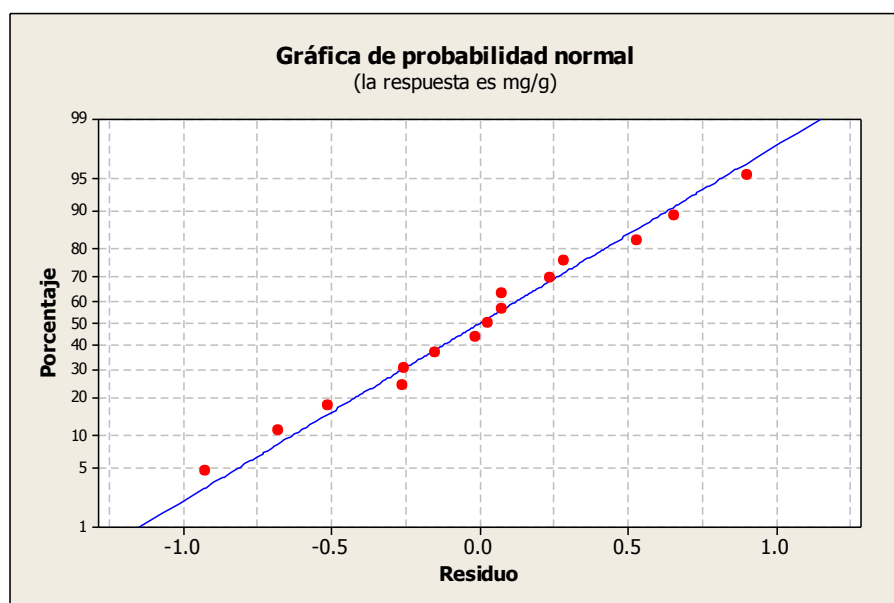
## ANEXO 11

Análisis de varianza del análisis superficie respuesta a 3 factores y 3 niveles para la para la optimización de la inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter* sp , la respuesta se de en caantidad de proteína inmovilizada (mg /g soporte )

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	9	85.1314	85.1314	9.4590	13.88	0.005
Lineal	3	55.0853	48.4352	16.1451	23.70	0.002
pH	1	53.7425	47.9106	47.9106	70.32	0.000
Tiempo	1	1.0672	0.4321	0.4321	0.63	0.462
Fza Ionica	1	0.2756	0.0743	0.0743	0.11	0.755
Cuadrado	3	28.7871	28.7082	9.5694	14.05	0.007
pH*pH	1	25.7353	25.5505	25.5505	37.50	0.002
Tiempo*Tiempo	1	1.3625	1.1428	1.1428	1.68	0.252
Fza Ionica*Fza Ionica	1	1.6894	1.6894	1.6894	2.48	0.176
interacción	3	1.2590	1.2590	0.4197	0.62	0.634
pH*Tiempo	1	0.7781	0.7130	0.7130	1.05	0.353
pH*Fza Ionica	1	0.4803	0.4803	0.4803	0.70	0.439
Tiempo*Fza Ionica	1	0.0006	0.0006	0.0006	0.00	0.978
Error residual	5	3.4066	3.4066	0.6813		
Falta de ajuste	3	3.3743	3.3743	1.1248	69.72	0.014
Error puro	2	0.0323	0.0323	0.0161		
Total	14	88.5379				

## ANEXO 12

Gráfica de probabilidad normal del análisis de superficie respuesta para la optimización de la inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter sp* CH27, la respuesta se da en proteína inmovilizada (mg /g soporte )



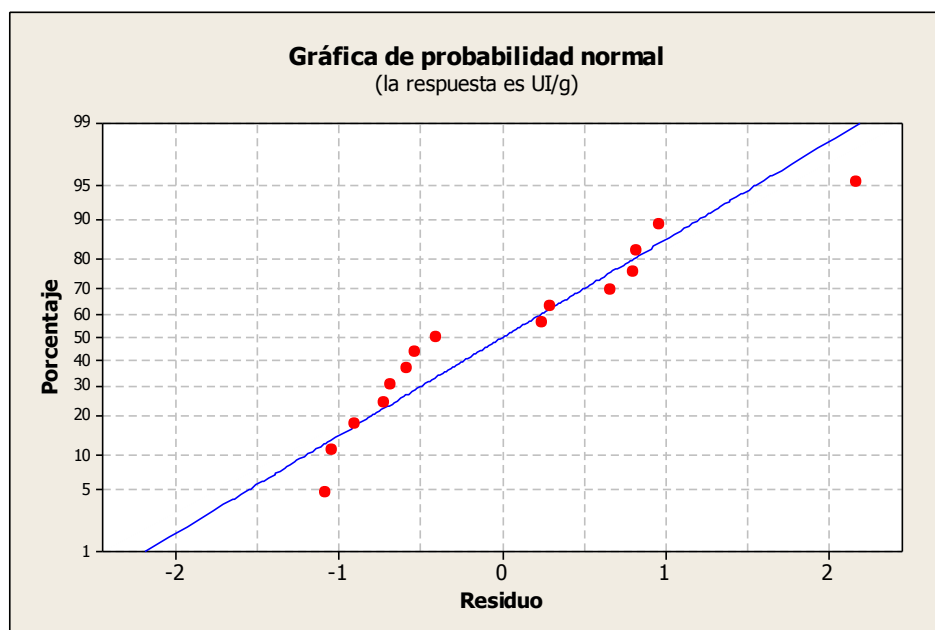
## ANEXO 13

**Análisis de varianza del análisis superficie respuesta a 3 factores y 3 niveles para la optimización de la inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter* sp , la respuesta se da en Actividad enzimática (U /g soporte ).**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	9	105.558	105.558	11.7287	4.75	0.051
Lineal	3	27.599	43.290	14.4299	5.84	0.043
pH	1	14.147	18.356	18.3562	7.43	0.042
Tiempo	1	13.444	24.796	24.7956	10.03	0.025
Fza Ionica	1	0.008	0.370	0.3698	0.15	0.715
Cuadrado	3	62.790	64.664	21.5548	8.72	0.020
pH*pH	1	49.740	47.359	47.3594	19.16	0.007
Tiempo*Tiempo	1	13.017	13.043	13.0431	5.28	0.070
Fza Ionica*Fza Ionica	1	0.033	0.033	0.0329	0.01	0.913
interacción	3	15.170	15.170	5.0565	2.05	0.226
pH*Tiempo	1	0.195	0.340	0.3401	0.14	0.726
pH*Fza Ionica	1	7.305	7.305	7.3051	2.96	0.146
Tiempo*Fza Ionica	1	7.670	7.670	7.6696	3.10	0.138
Error residual	5	12.358	12.358	2.4717		
Falta de ajuste	3	11.935	11.935	3.9782	18.78	0.051
Error puro	2	0.424	0.424	0.2118		
Total	14	117.917				

## ANEXO 14

Gráfica de probabilidad normal del análisis de superficie respuesta para la optimización de la inmovilización de la lipasa producida por *Marinobacter* sp, la respuesta se de actividad enzimática por g de soporte.



## ANEXO 15

**Resultados según el Diseño compuesto central a 2 factores y 3 niveles para determinar el efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada**

Experimento N°	pH	Temperatura	Absorbancia promedio	Act.enzimatica ( $\mu\text{mol/mlxmin}$ )	Act. Enzimática/g U/g-soporte
1	5	10	0.0075	0.0043	0.2187
2	9	50	0.24	0.144	7.3242
3	5	50	0.007	0.003	0.1525
4	7	40	0.2005	0.363	18.4632
5	7	20	0.0855	0.155	7.88
6	9	10	0.075	0.0546	2.777
7	7	30	0.161	0.2919	14.8468
8	7	30	0.159	0.2856	14.526
9	8	30	0.3015	0.2209	11.2356
10	6	30	0.039	0.077	3.916

## ANEXO 16

### Datos obtenidos para calcular el rendimiento de inmovilización

	Absorbancia 410 nm	Absorbancia 410 nm	Actividad enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{ml}$ )	Act. Especifica ( $\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}$ )	Actividad Residual ( % )
Enzima libre (crudo enzimático)	0.818	0.818	0.4454	0.5964	100
Enzima inmovilizada	0.667	0.667	0.3630	0.4418	81.50

Apartir de las actividades específicas se calculó el rendimiento de inmovilización:

$$\text{Rendimiento de inmovilización (\%)} = \frac{\text{Actividad específica de lipasa inmovilizada}}{\text{Actividad específica de lipasa libre}} * 100$$

$$\text{Rendimiento de inmovilización (\%)} = 74.0\%$$